



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Estudio *in silico* de la reactividad y propiedades
fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y
quinona metilada con glutatión, aminoácidos y
poliaminas de *Candida albicans***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Jhonatan RABANAL SANCHEZ

ASESOR

Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rabanal J. Estudio *in silico* de la reactividad y propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, aminoácidos y poliaminas de *Candida albicans* [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional): 0000 – 0002 – 6534 - 7406

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000 – 0003 – 4176 - 1618

DNI del autor: 46824380

Grupo de investigación: Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “MARCO ANTONIO GARRIDO MALO”

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:
AUTOFINANCIADA

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

CIUDAD DE LIMA

12°03'00'' S

77°02'00'' O

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2016-2017



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Siendo las 13:20 hrs. del 24 de octubre de 2019 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. María Elena Salazar Salvatierra e integrado por los siguientes miembros: Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (Asesor), Dr. Edgar Robert Tapia Manrique y Mg. Nelson Bautista Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**Estudio *in silico* de la reactividad y propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, aminoácidos y poliaminas de *Candida albicans***" presentado por el Bachiller en Tecnología Médica **JHONATAN RABANAL SANCHEZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:


18 (DIECIOCHO) - MUY BUENO

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Tecnología Médica **JHONATAN RABANAL SANCHEZ**, el Grado Académico de Magíster en **Microbiología**.

Siendo las 14:40 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 14:50 hrs. del 24 de octubre de 2019.


Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Presidenta


Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro - Asesor


Dr. Edgar Robert Tapia Manrique (P. Aux., T.C.)
Miembro


Mg. Nelson Bautista Cruz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Para examinar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible,
de todas las cosas, al menos una vez en la vida

Rene Descartes. *Principios de filosofía*.

Agradecimientos

-Agradezco a mis padres y hermanos todo el apoyo brindado en el proceso de mi desarrollo profesional.

-Agradezco el apoyo brindado por los profesores de la facultad de Farmacia y Bioquímica, ya que sin sus valiosos conocimientos y experiencia no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis.

-Agradezco a mi asesor Julio Ruiz Quiroz por su apoyo constante y las recomendaciones que siempre fueron acertadas.

-Finalmente, un agradecimiento especial a todas las personas que estuvieron a mi alrededor, amigos y compañeros de estudios, en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes del problema	3
2.2 Aspectos teóricos	5
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	16
3.1 Tipo y diseño de investigación	16
3.2 Unidad teórica de análisis	16
3.3 Población de estudio	16
3.4 Tamaño de muestra	16
3.5 Selección de la muestra	16
3.6 Técnicas de recolección de datos	16
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Resultados	19
4.2 Discusión	66
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

Tabla 2. pKa de los grupos químicos ionizables

Tabla 3. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Tabla 4. Energía de activación de los átomos de carbono

Tabla 5. Área de superficie accesible por solvente (SASA) de los átomos de carbono

Tabla 6. Score de los átomos de carbono

Tabla 7. Reacciones metabólicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

Tabla 8. Reacciones metabólicas de compuestos derivados del eugenol, puede observarse entre paréntesis el producto de cada reacción

Tabla 9. Reacciones catabólicas de compuestos derivados de epóxido de eugenol

Tabla 10. Reacciones catabólicas de compuestos derivados de quinona metilada

Tabla 11. Reacciones metabólicas catalizadas por citocromo P450

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada

Tabla 13. pKa de los grupos químicos ionizables

Tabla 14. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Tabla 15. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión

Tabla 16. Propiedades fisicoquímicas de la espermina y espermidina

Tabla 17. Abundancia en porcentajes de cada Microespecie a diferente pH

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina

Tabla 19. pKa de los grupos ionizables

Tabla 20. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina

Tabla 22. pKa de los grupos ionizables

Tabla 23. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Tabla 24. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina

Tabla 25. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina

Tabla 26. Coeficiente de correlación de Spearman del eugenol

Tabla 27. Coeficiente de correlación de Spearman del epóxido de eugenol

Tabla 28. Coeficiente de correlación de Spearman de quinona metilada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aductos de quinona metilada-glutación²⁸
- Figura 2.** Principales poliaminas⁴⁷
- Figura 3.** Reacciones de apertura del anillo epóxido⁵¹
- Figura 4.** Reacciones del anillo epóxido con aminas⁵²
- Figura 5.** Estructura química del eugenol⁸
- Figura 6.** Epoxidación del eugenol²¹
- Figura 7.** Formación de quinonas a partir de compuestos fenólicos⁵⁵
- Figura 8.** Mecanismo de formación de quinona metilada a partir de eugenol. Se aprecia la formación de un aducto entre quinona metilada y glutación²⁰
- Figura 9.** Estructura química del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada
- Figura 10.** Estructura química en 3D del eugenol
- Figura 11.** Estructura química en 3D del epóxido de eugenol y quinona metilada
- Figura 12.** Primera etapa en el metabolismo del eugenol
- Figura 13.** Metabolismo del compuesto E1
- Figura 14.** Metabolismo del compuesto E2
- Figura 15.** Metabolismo del compuesto E3
- Figura 16.** Primera etapa en el metabolismo del epóxido de eugenol
- Figura 17.** Metabolismo del compuesto P1
- Figura 18.** Catabolismo del compuesto P2
- Figura 19.** Catabolismo del compuesto P3
- Figura 20.** Primera etapa en el catabolismo de quinona metilada
- Figura 21.** Catabolismo del compuesto Q1
- Figura 22.** Catabolismo del compuesto Q2
- Figura 23.** Catabolismo del compuesto Q3
- Figura 24.** Productos del metabolismo del eugenol
- Figura 25.** Productos del metabolismo del eugenol
- Figura 26.** Productos del metabolismo del epóxido de eugenol
- Figura 27.** Productos del metabolismo del epóxido de eugenol

Figura 28. Estructura del aducto epóxido de eugenol-glutación

Figura 29. Estructura del aducto quinona metilada-glutación (estructura 1)

Figura 30. Estructura del aducto quinona metilada-glutación (estructura 2)

Figura 31. Productos del catabolismo del aducto de quinona metilada-glutación (estructura 1)

Figura 32. Productos del catabolismo del aducto de quinona metilada-glutación (estructura 2)

Figura 33. Productos del catabolismo del aducto de epóxido de eugenol-glutación

Figura 34. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-cisteína. $\Delta_f G^\circ = -406.13$ KJ/mol

Figura 35. Estructura química del aducto de quinona metilada-cisteína (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = -186.65$ KJ/mol

Figura 36. Estructura química del aducto de quinona metilada-cisteína (estructura 2). $\Delta_f G^\circ = -181.47$ KJ/mol

Figura 37. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-lisina. $\Delta_f G^\circ = -324.60$ KJ/mol

Figura 38. Estructura química del aducto de quinona metilada-lisina (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = -105.12$ KJ/mol

Figura 39. Estructura química del aducto de quinona metilada-lisina (estructura 2). $\Delta_f G^\circ = -99.94$ KJ/mol

Figura 40. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-arginina. $\Delta_f G^\circ = -31.61$ KJ/mol

Figura 41. Estructura química del aducto de quinona metilada-arginina (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = 187.87$ KJ/mol

Figura 42. Estructura química del aducto de quinona metilada-arginina (estructura 2). $\Delta_f G^\circ = 193.05$ KJ/mol

Figura 43. Estructura química de la espermina

Figura 44. Estructura química de la espermidina

Figura 45. Microespecie S-1

Figura 46. Microespecie S-2

Figura 47. Microespecie S-3

Figura 48. Microespecie SD-1

Figura 49. Microespecie SD-2

Figura 50. Microespecie SD-3

Figura 51. Aducto epóxido de eugenol-espermina

Figura 52. Aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 53. Aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

Figura 54. Estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-espermina

Figura 55. Estructura en 3D del aducto de quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 56. Estructura en 3D del aducto de quinona metilada-espermina (estructura 2)

Figura 57. Aducto epóxido de eugenol-espermidina

Figura 58. Aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Figura 59. Aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

Figura 60. Estructura en 3D del aducto epóxido de eugenol-espermidina

Figura 61. Estructura en 3D del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Figura 62. Estructura en 3D del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

Figura 63. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

Figura 64. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

Figura 65. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

Figura 66. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

Figura 67. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 68. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 69. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 70. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

Figura 71. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

Figura 72. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

Figura 73. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

Figura 74. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermidina

Figura 75. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermidina

Figura 76. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Figura 77. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Figura 78. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Figura 79. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

Figura 80. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

RESUMEN

El eugenol es un fenilpropanoide derivado de plantas medicinales y con actividad antifúngica. El estrés oxidativo es uno de los mecanismos que explican su actividad anti-*Candida*. Este estudio determinó las propiedades fisicoquímicas y la reactividad *in silico* del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada; se encontró que el eugenol y derivados poseen la capacidad para atravesar membranas biológicas y que el eugenol puede ser metabolizado hasta epóxido de eugenol. Además, se determinaron las propiedades fisicoquímicas y reactividad, *in silico*, de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, aminoácidos, espermidina y espermina. Se encontró que la formación de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión es termodinámicamente favorable, por lo que, podría ser un mecanismo que explique la disminución de la concentración de glutatión reducido en *Candida albicans* tratada con eugenol. Además, se halló que los aductos de epóxido de eugenol con cisteína, lisina y arginina, son termodinámicamente favorables, igualmente, los aductos de quinona metilada con cisteína y lisina. Asimismo, la formación de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con espermina y espermidina, es un proceso termodinámicamente no favorable. Por último, se determinó *in silico* las reacciones metabólicas de cada aducto en microorganismos aeróbicos, siendo los aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión susceptibles a la desaminación oxidativa y desalquilación oxidativa.

Palabras claves: Eugenol, epóxido de eugenol, quinona metilada, mecanismo de acción, actividad anti-*Candida*.

ABSTRACT

Eugenol is a phenylpropanoid derived from medicinal plants and with antifungal activity. In addition, oxidative stress is one of the mechanisms that explain the anti-Candida activity of eugenol. This study determined the physicochemical properties and in silico reactivity of eugenol, eugenol epoxide and methylated quinone; it was found that eugenol and derivatives possess the ability to cross biological membranes and that eugenol can be metabolized to eugenol epoxide. In addition, the physicochemical properties and reactivity, in silico, of eugenol epoxide adducts and quinone methylated with glutathione, amino acids, spermidine and spermine were determined. It was found that the formation of eugenol-glutathione epoxide adducts and methylated-glutathione quinone is thermodynamically favorable, therefore, it could be a mechanism that explains the decrease in the concentration of reduced glutathione in *Candida albicans* treated with eugenol. On the other hand, it was found that the adducts of eugenol epoxide with cysteine, lysine and arginine are thermodynamically favorable, as well, the adducts of quinone methylated with cysteine and lysine. Likewise, the formation of the adducts of eugenol epoxide and quinone methylated with spermine and spermidine, is a thermodynamically unfavorable process. Finally, the metabolic reactions of each adduct in aerobic microorganisms were determined in silico, being the adducts of eugenol-glutathione epoxide and methylated-glutathione quinone susceptible to oxidative deamination and oxidative dealkylation.

Key words: Eugenol, eugenol epoxide, methylated quinone, mechanism of action, anti-Candida activity.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Candida albicans es una levadura que habita en las membranas de las mucosas, suele ser inocua en un hospedero inmunocompetente^{1,2}. Sin embargo, en condiciones de inmunodepresión, resulta ser patogénica^{1,2}. En las últimas décadas, el número de pacientes inmunodeprimidos ha aumentado significativamente; por lo tanto, estarían en riesgo de contraer alguna infección fúngica oportunista^{3,4}. Entre los agentes etiológicos causantes de micosis oportunistas más frecuentes tenemos a los géneros *Aspergillus sp*, *Candida sp* y *Cryptococcus sp*^{3,4}.

En las últimas décadas el número de cepas con resistencia a algún antifúngico ha ido en aumento^{5,6,7}. Se ha reportado un importante incremento en la resistencia a azoles en especies de *Candida*^{5,6}. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de encontrar tratamientos alternativos y estrategias preventivas para estas infecciones fúngicas oportunistas⁷.

El eugenol es un fenilpropanoide extraído a partir diversos aceites esenciales, principalmente de *Myristica fragrans*, *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum verum* y *Zygium aromaticum*^{8,9}. En los últimos años, ha crecido su importancia como anestésico, analgésico, antiinflamatorio, antifúngico, etc. Sin embargo, aún no se han esclarecido los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos^{8,9}.

El efecto antifúngico del eugenol en *Candida albicans*, ha sido estudiado activamente, con resultados positivos, siendo sugerido como un posible tratamiento de candidiasis^{10,11,12}.

Se ha propuesto la inhibición en la síntesis del ergosterol¹³, el estrés oxidativo¹⁴, y el daño de la membrana celular como posibles mecanismos moleculares responsables del efecto antifúngico del eugenol en *Candida albicans*^{15,16,17}.

Un estudio encontró evidencias de que la actividad antibacteriana de *Syzygium aromaticum*, la cual es una planta medicinal que tiene entre sus principios activos eugenol, se debe a una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática y al estrés oxidativo¹⁸. Asimismo, este estudio encontró niveles bajos de glutatión reducido y altos niveles de especies reactivas del oxígeno¹⁸.

La quinona metilada es un producto del metabolismo de compuestos fenólicos como el eugenol^{19,20}. Al ser una molécula altamente electrofílica, tiende a reaccionar con diversas moléculas celulares como ADN y proteínas¹⁹. La unión a estas macromoléculas podría causar diversos efectos citotóxicos y genotóxicos^{19,20}.

El epóxido de eugenol es también un producto del metabolismo del eugenol, y tiene en teoría capacidad para formar aductos con proteínas y ADN²¹. Sin embargo, es rápidamente eliminado por las enzimas epóxido hidrolasa y glutatión S-transferasa²¹.

Por otro lado, las poliaminas son productos del metabolismo de aminoácidos, se ha relacionado los niveles altos de poliaminas con la respuesta al estrés oxidativo inducido por eugenol²².

Por tanto, este estudio propone la formación de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, aminoácidos y poliaminas de *Candida albicans*; como un efecto generado por el estrés oxidativo. Por lo que se realizó un estudio *in silico* de las propiedades fisicoquímicas QSAR (relación cuantitativa estructura actividad) del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada; asimismo, se estudió la reactividad *in silico* frente al citocromo P450 y el catabolismo en microorganismos aeróbicos. Después se determinaron las propiedades fisicoquímicas QSAR *in silico* de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión; así como, su catabolismo en microorganismos aeróbicos. También se determinó *in silico* la variación de la energía libre de Gibbs de formación de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con aminoácidos. Para este estudio se seleccionaron los aminoácidos más nucleofílicos, siendo los siguientes: lisina, arginina y cisteína²³. Adicionalmente, se determinó *in silico* el desplazamiento químico de núcleos atómicos del hidrógeno (¹H RMN) de todas moléculas analizadas.

Además, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de las poliaminas y sus posibles microespecies a diferente pH. Entre las poliaminas que se sintetizan en respuesta al estrés oxidativo en hongos, como *Candida albicans*, están la espermina y espermidina; siendo estas dos las más abundantes²⁴. Se estudió *in silico* las propiedades fisicoquímicas QSAR de aductos de epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermina, epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina, asimismo, se estudió *in silico* su catabolismo en microorganismos aeróbicos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

-Determinar las propiedades fisicoquímicas y la reactividad de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, aminoácidos y poliaminas de *Candida albicans*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas y la reactividad del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y la reactividad de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión.
- Determinar la variación de la energía libre de Gibbs de formación de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con aminoácidos.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y reactividad de espermidina y espermina.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y la reactividad de aductos de epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermina, epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina.

II.MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del problema

Las micosis oportunistas son un grave problema de salud pública, ya que ponen en peligro la vida de los pacientes inmunodeprimidos^{3,4}. En los últimos años, el número de casos de resistencia a antifúngicos en *Candida albicans* ha aumentado. Lo que obliga a la sociedad a encontrar nuevas terapias que complementen o reemplacen a las actuales^{6,7}.

El eugenol es un fenilpropanoide con propiedades anestésicas, antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitarias, antiinflamatorias, anticancerígenas y antifúngicas^{8,9}. Además, en las últimas décadas, diversas investigaciones han demostrado el efecto antifúngico del eugenol en *Candida albicans*^{8,10,11,12}. Siendo su actividad inhibitoria comparable con el fluconazol⁸. Además, estos estudios han demostrado que el eugenol posee actividad antifúngica contra otras especies de *Candida* como *C. krusei* y *C. glabrata*^{8,11}.

El eugenol no posee un solo mecanismo que explique su actividad antifúngica en *Candida albicans*⁸; sino que existen una serie de mecanismos propuestos: inhibición de la síntesis de ergosterol¹³, alteración en la membrana celular¹⁷, y estrés oxidativo¹⁴.

El ergosterol es un esteroide de la membrana de los hongos y su presencia es esencial para el correcto funcionamiento de dicha membrana. Por lo que, diversos antifúngicos, como los azoles, interfieren en la biosíntesis del ergosterol. Un estudio realizado en cepas de *Candida albicans* resistentes a fluconazol, reportó la disminución en la biosíntesis de ergosterol; por lo que, este estudio propuso este proceso como uno de los mecanismos de acción del eugenol¹³.

Se realizó una investigación en la que se analizó la actividad antifúngica de diversos terpenoides, entre ellos el eugenol; se determinó que el aumento en la fluidez de la membrana seguido de una desestabilización de dicha membrana celular, es uno de los responsables del efecto antifúngico del eugenol en *Candida albicans*¹⁷.

Se encontró que derivados del eugenol, como el nitroeugenol, pueden producir desestabilización y alteraciones de la membrana plasmática, así como estrés oxidativo en *Botrytis cinerea*²⁵. Asimismo, otro estudio *in vitro* en este mismo hongo, encontró niveles altos de peróxido de hidrógeno, cuando fue tratado con eugenol; lo cual apoya la idea de que este induce la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)²⁶.

Se ha descrito que el eugenol eleva los niveles de radicales libres y genera estrés oxidativo en *Candida albicans*¹⁴. Como consecuencia de dicho fenómeno, se ha observado niveles altos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, hecho que demuestra la presencia de peroxidación lipídica. A su vez se encontraron niveles altos de actividad superóxido dismutasa y catalasa. Se reportó un aumento inicial en la actividad del glutatión peroxidasa, seguido de una disminución de dicha actividad enzimática. Esta investigación encontró una notable disminución del glutatión reducido. Por lo que, este estudio sugiere que la causa de los bajos niveles de glutatión reducido, se debería a la formación de un aducto covalente entre dicho tripéptido y una quinona metilada¹⁴.

Se ha encontrado que la citotoxicidad del eugenol puede ser alterada por la presencia de agentes químicos capaces de aumentar o disminuir los radicales tiol en las células²⁷. Las células tratadas con eugenol y dietilmaleato mostraron una mayor disminución de los niveles de glutatión y mayores efectos citotóxicos²⁷. En cambio, células tratadas con eugenol y N-acetilcisteína mostraron menores efectos citotóxicos²⁷; asimismo, los niveles de glutatión no disminuyeron mucho²⁷. Lo que proporciona evidencias de la importancia del glutatión en la actividad citotóxica del eugenol²⁷.

Se evaluó la capacidad del metileugenol y derivados de formar aductos con el glutatión reducido²⁰. Se encontró que el metileugenol puede ser metabolizado por el citocromo P450 y los derivados de estas reacciones pueden formar aductos con el glutatión reducido²⁰. Asimismo, se encontró que el metileugenol puede sufrir una o-desmetilación, catalizada por el citocromo P450, y formar eugenol²⁰; este a su vez puede ser metabolizado hasta una quinona metilada²⁰. Se reportó la formación de un aducto entre esta quinona metilada y un glutatión reducido²⁰ (figura 1). Estudios señalan la formación de aductos de quinona metilada-glutatión como la causa del agotamiento celular de glutatión reducido^{14,19,27}.

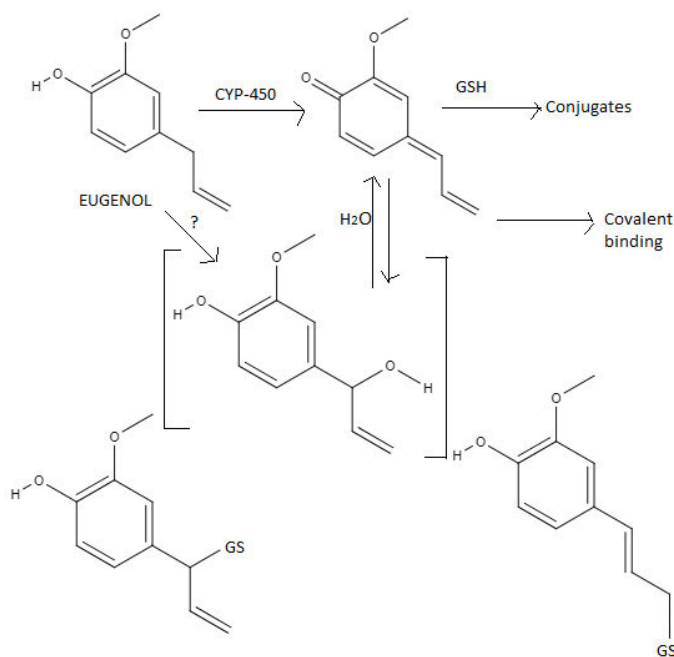


Figura 1. Aductos de quinona metilada-glutatión²⁸

Desde hace algunos años, se conoce que el eugenol puede ser modificado por el citocromo P450, generando una serie de metabolitos^{20,21}. El citocromo P450 puede catalizar reacciones de epoxidación en alilbencenos²¹, como el eugenol, y producir epóxidos, como productos de reacción²¹.

El epóxido de eugenol es un producto del metabolismo del eugenol. Al ser una molécula altamente electrofílica, posee la capacidad de formar aductos con proteínas y ADN²¹. Por lo que, se pensó encontrar aductos de ADN y proteínas en células tratadas con eugenol. Sin embargo, no se encontraron aductos de ADN y solo pequeñas cantidades de aductos de proteínas. Por lo tanto, dicho estudio propuso dos mecanismos de desintoxicación

utilizadas por las células tratadas con eugenol²¹. Uno de ellos sería una hidrólisis causada por la enzima epóxido hidrolasa y el otro mecanismo sería la conjugación del epóxido de eugenol con glutatión reducido²¹.

Recientemente, un estudio *in silico* encontró que la formación de aductos de epóxido de eugenol y derivados de la peroxidación lipídica (como el malondialdehído) es un proceso termodinámicamente favorable²⁹.

Las poliaminas son moléculas implicadas en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo, en diversos tipos celulares (procariotas y eucariotas). Las poliaminas disminuyen los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en hongos^{24,30}. Con respecto a la reactividad de las poliaminas, un estudio propuso que pueden eliminar los radicales peroxilo o alquilo derivados de ácidos grasos poliinsaturados³¹.

Las células de la línea celular HSC-2 tratadas con eugenol redujeron sus niveles intracelulares de glutatión reducido²². Asimismo, se reportó un aumento en la síntesis de poliaminas (putrescina, espermidina y ornitina)²². Lo cual sugiere que cumplen un rol en el control del estrés oxidativo inducido por eugenol²².

Se realizó un estudio donde se determinaron diversas propiedades fisicoquímicas QSAR de compuestos fenólicos, entre ellos eugenol, se encontró una correlación lineal entre las propiedades fisicoquímicas QSAR y la concentración inhibitoria mínima (MIC) en *Candida albicans*³². Por lo que, este estudio sugiere que podrían emplearse las propiedades fisicoquímicas QSAR para predecir la actividad anti-*Candida* de diversos compuestos fenólicos³².

2.2 Aspectos teóricos

Candida albicans

Es una levadura comensal oportunista que coexiste como parte de la microbiota mucocutánea, genitourinaria y gastrointestinal en el ser humano sano^{1,2}. Suele colonizar las membranas mucosas en el 30 a 60% de individuos sanos^{1,2}. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de inmunodepresión es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, poniendo en riesgo la vida del paciente^{1,2,33}. Este aumento en la incidencia de candidiasis sistémicas es consecuencia de diversos factores, como la inmunodeficiencia por VIH, enfermedades neoplásicas, tratamientos con corticoides y el uso de antibióticos de amplio espectro³⁴.

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado en la célula, en el cual existe un desequilibrio en la producción de agentes oxidantes^{35,36}. Lo que conlleva a una alteración en la homeostasis oxido-reducción^{35,36}. Esta alteración puede deberse a un aumento en la velocidad de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o un deterioro de los sistemas de respuesta al estrés oxidativo³⁵⁻³⁷. *Candida albicans* no está exenta a estos problemas generados por los ROS, ya que en condiciones normales genera ROS en la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias. Asimismo, diversas sustancias exógenas

pueden incrementar los niveles de ROS, en *Candida albicans*, ocasionando daños en proteínas, lípidos y ADN^{37,38}.

En *Candida albicans*, así como en la mayoría de eucariotas, las ROS se generan como intermediarios de reacción en la conversión de oxígeno a agua^{37,39}. Pues el oxígeno acepta electrones y protones en su paso por la membrana interna de las mitocondrias. Estos intermediarios de reacción son: radical superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo. Dichos intermediarios pueden escapar de la cadena transportadora de electrones, en condiciones normales^{37,39}.

Mecanismos que contrarrestan al estrés oxidativo en levaduras

Los eucariotas poseen una variedad de moléculas enzimáticas y no enzimáticas, que cumplen la función de contrarrestar los efectos nocivos de las ROS^{36,37}. En este sentido, las moléculas más importantes que cumplen dicha tarea son: glutatión, catalasa, superóxido dismutasa (SOD), peroxiredoxinas, glutatión peroxidasa, sulfiredoxinas, tioredoxinas, metionina sulfóxido reductasa, glutaredoxinas, glutatión S-transferasa, entre otras^{36,37}.

El glutatión (L- γ -glutamyl-L-cisteinilglycine) es un tripéptido sintetizado por dos enzimas (γ -L-glutamyl-L-cisteína sintetasa y glutatión sintetasa). Este tripéptido posee un grupo tiol que le confiere capacidad reductora^{37,40}.

Sin embargo, en determinadas condiciones los niveles del radical superóxido a nivel intracelular están elevados^{36,37}. Una enzima conocida como superóxido dismutasa (SOD) cataliza la eliminación de estos radicales, produciendo oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrogeno como productos de reacción^{36,37,40}. Luego el peróxido de hidrogeno es reducido por el glutatión (GSH), reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa. En esta reacción se genera glutatión oxidado (GSSG) y agua como productos^{36,37,40}. Asimismo, el peróxido de hidrogeno, también, puede ser reducido por la enzima catalasa. El GSSG, luego, es reducido para formar nuevamente GSH. Esta reacción es medida por la enzima glutatión reductasa. Por lo que utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador de electrones^{36,37,40}.

Ciertos compuestos xenobióticos pueden ser metabolizados por la enzima glutatión S-transferasa. Esta enzima cataliza la conjugación de moléculas electrofílicas al glutatión para su posterior eliminación³⁷. Se han encontrado en *Saccharomyces cerevisiae* genes que codifican esta enzima, siendo los más importantes: *GTT1*, *GTT2*^{37,41}.

Las peroxiredoxinas son una familia de proteínas, bastante conservadas, presentes en organismos eucariotas y procariotas. Estas proteínas catalizan la reducción del peróxido de hidrogeno o hidroperóxidos orgánicos en agua o alcohol, respectivamente. Las peroxiredoxinas poseen una cisteína en su sitio catalítico y es la responsable de la actividad reductora⁴².

Al oxidarse la cisteína de las peroxiredoxinas se genera un ácido sulfónico o sulfínico. Por mucho tiempo se pensó que esta reacción era irreversible y no existía forma de reciclaje. Sin embargo, se descubrió una familia de proteínas que reducen a las peroxiredoxinas y las regresan a su estado inicial. A este grupo de proteínas se las llamo sulfiredoxinas^{37,43}.

Las tioredoxinas son enzimas oxidoreductasas con capacidad para reducir puentes disulfuro de proteínas, mediante la oxidación de sus residuos de cisteína presentes en su centro activo^{37,44}. Las tioredoxinas oxidadas pueden ser reducidas, mediante la enzima tioredoxina reductasa; esta enzima realiza la transferencia de electrones del NADPH a las tioredoxinas oxidadas. Este es un mecanismo que utilizan la mayor parte de células para reparar el daño producido por el estrés oxidativo en sus proteínas^{37,44}.

En condiciones de estrés oxidativo la metionina puede oxidarse a sulfóxido de metionina. Puesto que la oxidación de la metionina causa daño en las proteínas^{37,45}. Se ha encontrado un grupo de enzimas, las metionina sulfóxido reductasas, que se encargan de revertir esta oxidación^{37,45}.

Por último, las glutaredoxinas son oxidoreductasas presentes en organismos que contienen GSH^{37,46}. Estas enzimas se encargan de reducir puentes disulfuro que se forman entre los grupos tiol de diferentes proteínas y grupos tiol de proteínas con el GSH; por lo que se utilizan los electrones transferidos del nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). De esta manera se promueve la reparación de proteínas dañadas por el estrés oxidativo^{37,46}.

Mecanismos que contrarrestan al estrés oxidativo en *Candida albicans*

Diversos estudios han descrito la capacidad que tiene *Candida albicans* para resistir a un ambiente de estrés oxidativo^{38,39}. Se ha demostrado que dicha capacidad es considerablemente mayor a la que poseen otras levaduras como *S. cerevisiae*^{38,39}.

La respuesta de *Candida albicans* al estrés oxidativo se compone de enzimas; siendo las más importantes la catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa³⁹. Es importante mencionar a las glutaredoxinas y tioredoxinas; ya que desempeñan un papel preponderante en la reparación del daño oxidativo en proteínas, plegamiento de proteínas y metabolismo del azufre en esta levadura³⁹.

El factor de transcripción Cap1 de la familia AP-1, relacionado con el Yap1 de la *S. cerevisiae*; está presente en *Candida albicans* y es activado, en presencia de ROS y fármacos³⁹. La activación de este factor de transcripción promueve la transcripción de genes claves para la respuesta al estrés oxidativo, como los genes CAT1 y TRX1. En condiciones en las que no existe estrés oxidativo, el Cap1 no puede trasladarse al núcleo; pues su secuencia de exportación nuclear (NES) interactúa con el factor de exportación nuclear Crm1³⁹. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, los residuos de cisteína específicos del Cap1 son oxidados. Esto desencadena un cambio conformacional en el Cap1 que inhibe la interacción del NES con el Crm1. Lo que promueve la síntesis de proteínas de respuesta al estrés oxidativo³⁹.

Las MAPK (quinasa de MAP), activadas por estrés, son proteínas que fosforilan otras quinasas corriente abajo. Estas quinasas pueden activar factores de transcripción^{38,39}. En condiciones de estrés oxidativo se activa una MAPKKK (quinasa de quinasa de quinasa de MAP) que fosforila y activa una MAPKK (quinasa de quinasa de MAP); la que fosforila y activa una SAPK^{38,39}. Las SAPK activadas se acumulan en el núcleo y activan diversas proteínas como factores de transcripción de respuesta al estrés oxidativo, quinasas, proteínas reguladoras del ciclo celular, entre otras. En presencia de peróxido de

hidrogeno se ha demostrado la activación de la cascada MAPK, en *Candida albicans*, y la acumulación en el núcleo del Hog1; esta proteína fosforila diversas proteínas involucradas en la tolerancia al estrés oxidativo^{38,39}.

Se ha demostrado que la activación de la quinasa Rad 53, en *Candida albicans*, en presencia de peróxido de hidrogeno. Asimismo, la activación de Rad 53 desencadena en la formación de estructuras micelares^{38,39}.

Poliaminas

Las poliaminas son cationes alifáticos derivados de aminoácidos, implicados en la respuesta celular contra el estrés oxidativo. A este grupo de compuestos nitrogenados pertenecen la putrescina, espermidina y espermina^{24,37,47} (Figura 2).

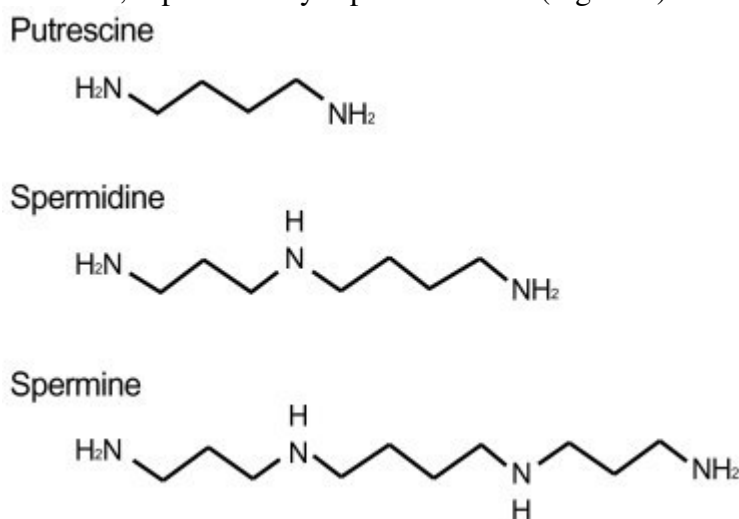


Figura 2. Principales poliaminas⁴⁷

Diversas investigaciones sugieren la posible intervención de las poliaminas en una serie de procesos celulares; tales como el control del ciclo celular, respuesta al estrés oxidativo, señalización celular, entre otros procesos^{24,30}. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos moleculares involucrados. Asimismo, se ha hecho muy notoria la participación de las poliaminas en procesos de estrés oxidativo. Sin embargo, el mecanismo molecular todavía no se conoce^{24,30}.

Al principio se propuso que las poliaminas podrían interactuar con el ADN y proteínas, mediante interacciones electrostáticas⁴⁸. Sin embargo, estudios recientes proponen que ellas desempeñan un papel en la modulación del homeostasis de ROS⁴⁸. Se ha propuesto dos mecanismos. En primer lugar, se menciona que las poliaminas pueden inhibir la autooxidación de metales. Por lo que no existirían electrones para la generación de ROS. También, podrían reaccionar directamente con los ROS. Aunque no existen evidencias *in vivo* de dicho proceso. En segundo lugar, se propone que las poliaminas pueden regular los sistemas antioxidantes, aumentando los niveles de antioxidantes; lo que se vería reflejado en una disminución de los niveles de ROS⁴⁸.

Biosíntesis de poliaminas

La distribución de las poliaminas es muy amplia, estando presentes tanto en eucariotas como en procariotas. Se ha reportado, en organismos eucariotas, niveles bajos de putrescina y una mayor concentración de espermidina y espermina²⁴.

En hongos, al igual que en animales, la ruta de biosíntesis de la putrescina es mediada por la enzima ornitina descarboxilasa. Esta enzima descarboxila a la ornitina generando putrescina. La putrescina puede aceptar un grupo aminopropilo y se convierte en espermidina. Esta reacción es mediada por las enzimas *S*-adenosilmetionina descarboxilasa y la espermidina sintasa. Por último, la espermidina recibe un grupo aminopropilo, una reacción muy similar a la anterior, y se convierte en espermina. Esta reacción es catalizada por la enzima espermina sintasa²⁴.

Epóxidos

Los epóxidos u oxiranos son éteres cíclicos que contienen un anillo de tres átomos; este anillo está sumamente tensionado, lo que ocasiona que las moléculas de epóxidos sean muy reactivas con nucleófilos^{49,50} (figura 3). Por lo tanto, las reacciones que alivien esta tensión generada en el anillo resultan ser más favorables^{49,50}. Asimismo, es preciso mencionar que una molécula nucleófila es aquella que posee un par de electrones no compartidos; por lo que, son susceptibles a reaccionar⁵⁰.

Diversos estudios señalan que moléculas con grupos epóxidos suelen reaccionar con moléculas nucleófilas. Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y algunos aminoácidos son considerados como moléculas nucleófilas⁵¹. Asimismo, los grupos epóxido pueden reaccionar con aminas primarias, secundarias y terciarias⁵² (Figura 4).

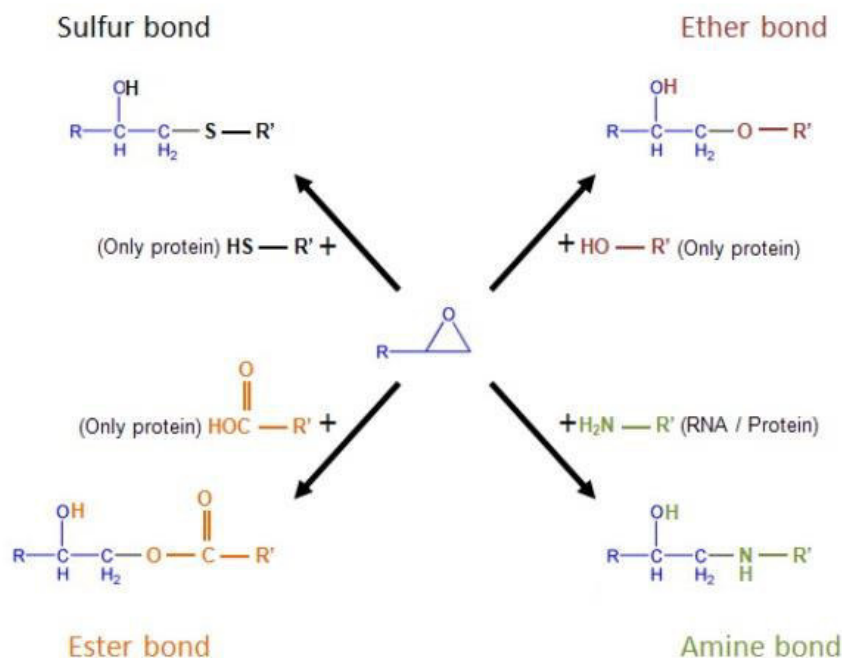


Figura 3. Reacciones de apertura del anillo epóxido⁵¹

En definitiva, se hace factible la idea de aductos de epóxidos con moléculas nucleófilas como ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas⁵¹.

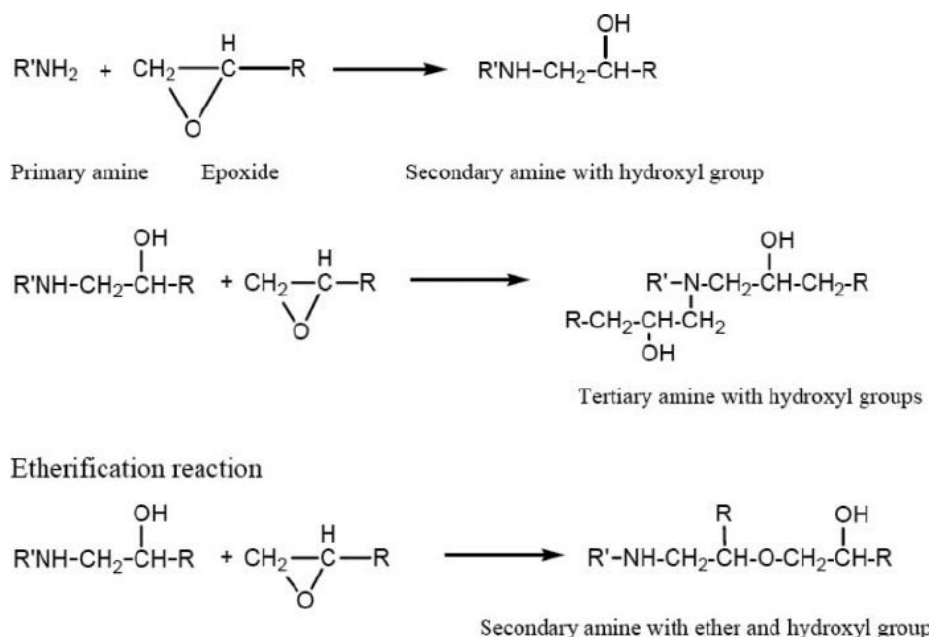


Figura 4. Reacciones del anillo epóxido con aminas⁵²

Eugenol

El eugenol es un fenilpropanoide, cuyo nombre en la nomenclatura IUPAC es 4 - alil - 2 - metoxifenol^{8,9} (Figura 5). Este compuesto fenólico es extraído de plantas, siendo las más importantes: *Myristica fragrans*, *Cinnamomum tamala*, *Zygium aromaticum*, *Pimenta racemosa* y especies del genero *Ocimum*. Asimismo, diversos estudios han demostrado sus propiedades anestésicas, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiano, antiparasitario, anticancerígeno y antifúngico^{8,9}.

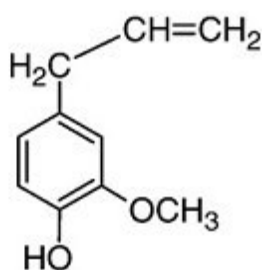


Figura 5. Estructura química del eugenol⁸

Actividad antioxidante del eugenol

En los últimos años diversos estudios han demostrado la actividad antioxidante del eugenol. Se ha demostrado que el eugenol evita el daño endotelial producido por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) e inhibe la generación de ROS. Igualmente demostró tener capacidad para inhibir radicales hidroxilo y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)^{8,9}. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la actividad antioxidante del eugenol frente a ROS y su capacidad para evitar el daño en el ADN^{8,9}.

El eugenol actúa de manera similar a otros fenoles, se cree que reacciona con ROS y los inactiva. Sin embargo, existen aspectos de estas interacciones que aún faltan esclarecer⁹.

Actividad antibacteriana del eugenol

Se ha realizado una serie de estudios que han demostrado la capacidad del eugenol de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*, así como gram-negativas de la familia enterobacteriaceae^{8,9}. Esta actividad antibacteriana se debería a la capacidad del eugenol de producir daño en la pared y membrana celular, produciendo la fuga de los componentes intracelulares de estas bacterias^{8,9}.

Actividad antiparasitaria del eugenol

Investigaciones *in vitro* sugieren que el eugenol posee capacidad para inhibir el crecimiento de parásitos de los géneros *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma*. Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos. Por lo que, investigaciones posteriores deberán aclarar esta probable actividad antiparasitaria⁸.

Actividad antifúngica del eugenol

Diversas investigaciones, realizadas en los últimos años, han probado la capacidad inhibitoria del eugenol frente a hongos filamentosos de los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium sp* y *Botrytis sp*¹⁰. Del mismo modo, se ha demostrado la capacidad del eugenol de inhibir hongos levaduriformes del genero *Candida* (*C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans*)⁸. Esta actividad antifúngica sería como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ergosterol^{8,13}, estrés oxidativo^{14,25,26} y daño en la membrana celular^{8,10,16,17}.

Actividad anticancerígena del eugenol

Se ha investigado, en los últimos años, activamente la actividad anticancerígena del eugenol⁹. Se encontró que un tratamiento conjunto de eugenol y gemcitabina reduce el crecimiento de células cancerígenas del carcinoma cervical⁹. Estudios realizados en ratones con cáncer gástrico determinaron que inhibe la metástasis y angiogénesis⁹. Del mismo modo, se ha encontrado indicios que podría inhibir el crecimiento de células cancerígenas de cáncer de piel y próstata. Sin embargo, aún faltan estudios confirmatorios⁹.

Se ha demostrado las propiedades citotóxicas del eugenol en células, de cáncer de mama, de la línea celular MCF-7. Lo que lo posiciona como posible antineoplásico⁸.

Actividad antiinflamatoria del eugenol

Se ha demostrado que el eugenol inhibe la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la ciclooxigenasa-2(COX-2). Asimismo, inhibe la quimiotaxis de leucocitos mononucleares⁸. Estudios *in vitro* demostraron que inhibe la activación del factor de transcripción NF-κ B⁸. Por último, estudios *in vivo* determinaron que el eugenol reduce la infiltración de neutrófilos en infecciones de animales de experimentación⁸.

Epóxido de eugenol

El epóxido de eugenol es un derivado del eugenol. Su nombre en la nomenclatura IUPAC es 2-metoxi-4-oxiranilmetil fenol^{21,53}.

Experimentalmente se puede generar la peroxidación del eugenol, utilizando un hidroperóxido orgánico y luz ultravioleta. Esto debido a que se pueden sintetizar epóxidos a partir de la reacción de un alqueno con un peróxido orgánico⁵³. En esta reacción un peróxido orgánico transfiere un átomo de oxígeno a un alqueno⁵⁰. Por lo tanto, como el eugenol posee un grupo alqueno alifático es susceptible a reaccionar con un peróxido orgánico generando un epóxido de eugenol⁵³.

Se sabe que en el metabolismo del eugenol, el citocromo P450, genera la oxidación de grupo alqueno del eugenol y se produce epóxido de eugenol²¹ (Figura 6).

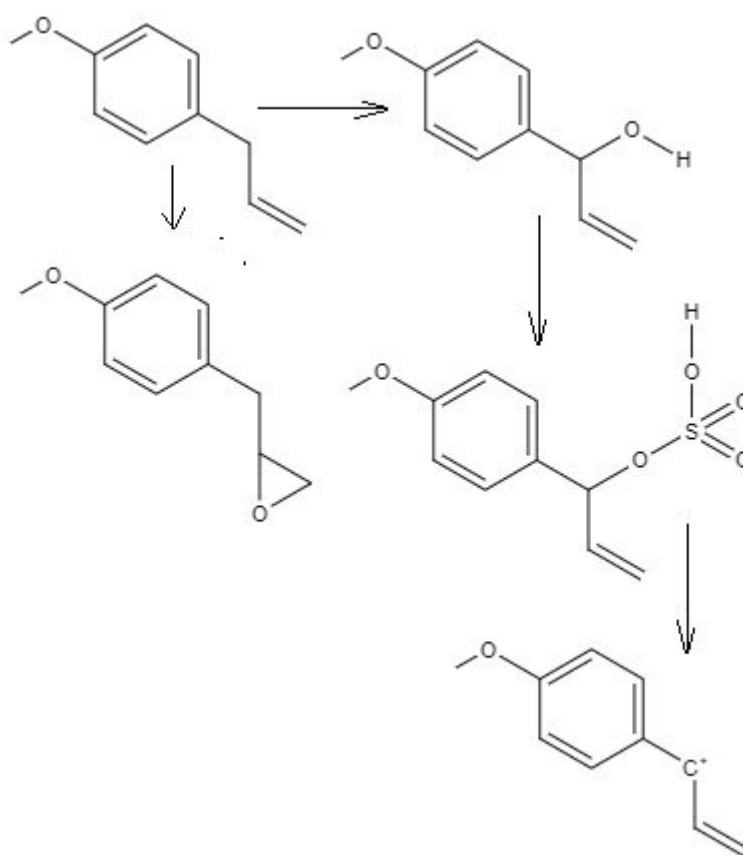


Figura 6. Epoxidación del eugenol²¹

El epóxido de eugenol es altamente electrofílico y, teóricamente, podría formar enlaces covalentes con moléculas nucleófilas^{21,54}. Por lo que es factible la idea de aductos covalentes de estos epóxidos con macromoléculas nucleófilas, en las células^{21,54}. Sin embargo, estudios *in vitro* no han encontrado indicios de la presencia de aductos de epóxido de eugenol con ADN y solo pequeñas cantidades de aductos de epóxido de eugenol con proteínas²¹. Por lo que, se postularon tres hipótesis que tratan de explicar estos resultados²¹. Una de estas hipótesis plantea que la epoxidación no ocurre *in vivo*²¹. Otra de estas hipótesis propone que los epóxidos se forman, pero no son suficientemente electrófilos como para formar aductos²¹. Por último, otra hipótesis, que es la más aceptada y concuerda con los hechos, postula que los epóxidos de eugenol se si producen *in vivo* y, además, poseen la capacidad de formar aductos con moléculas nucleófilas. Sin

embargo, las células poseen una serie de mecanismos para eliminar estos epóxidos. Por lo que, no se llegan a formar estos aductos covalentes²¹. Estudios realizados con enzimas epóxido hidrolasa demostraron la capacidad de estas enzimas de reaccionar con epóxido de eugenol. Por lo que, este sería un mecanismo utilizado por las células para eliminar los epóxidos de eugenol²¹.

Quinona metilada

Las quinonas son compuestos aromáticos que se forman en las células, generalmente por oxidación de compuestos fenólicos. Estas reacciones pueden ser catalizadas por citocromos P450, moléculas oxidantes, monooxigenasas o peroxidases. Suelen formarse como productos finales del metabolismo celular de sustancias exógenas. Casi siempre producen efectos citotóxicos, inmunotóxicos y/o genotóxicos, esto debido a su alta actividad electrofílica. Estas moléculas pueden formar aductos estables con ácidos nucleicos y proteínas⁵⁵ (figura 7).

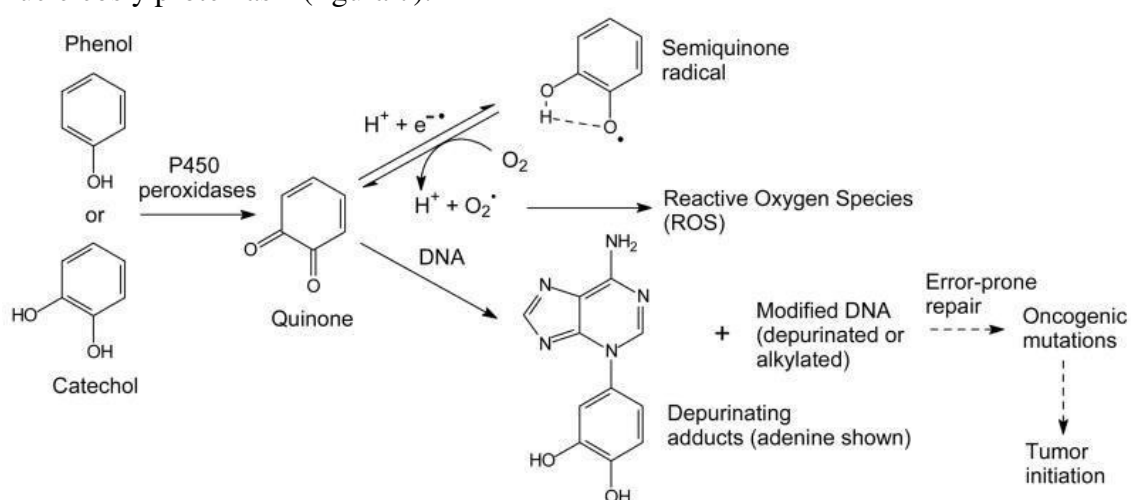


Figura 7. Formación de quinonas a partir de compuestos fenolicos⁵⁵

La quinona metilada difiere estructuralmente de las quinonas, pues un grupo metileno a reemplazado uno de los átomos de oxígeno del carbonilo de las quinonas. Esta sustitución produce una molécula más electrófila que las quinonas (Figura 8). Por lo que, en sistemas biológicos, la quinona metilada, puede formar aductos con péptidos, proteínas y ácidos nucleicos^{56,57}.

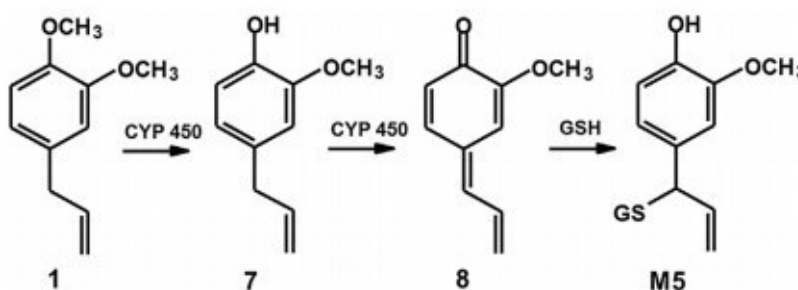


Figura 8. Mecanismo de formación de quinona metilada a partir de eugenol. Se aprecia la formación de un aducto entre quinona metilada y glutatión²⁰

Propiedades fisicoquímicas QSAR

La relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) es un método que permite predecir la reactividad y la actividad biológica de una sustancia a partir de su estructura química, mediante el cálculo computacional de determinadas propiedades fisicoquímicas (propiedades fisicoquímicas QSAR)^{58,59}. En los últimos años, se ha venido utilizando este método para predecir el comportamiento de diversos fármacos, llegando a predecir la farmacocinética de una droga⁵⁹. Asimismo, el desarrollo de los sistemas informáticos ha permitido calcular las propiedades fisicoquímicas QSAR en portales web. Entre las propiedades fisicoquímicas QSAR mas importantes tenemos⁵⁹:

- Área superficial de Van der Waals: es un área basada en los valores del radio de Van der Waals y determina la superficie donde podrían formarse interacciones intermoleculares⁵⁸.

- Coeficiente de Partición (LogP): es un parámetro que permite estimar la hidrofobicidad de una molécula⁶⁰.

- FSP3: Fracción de carbonos con hibridación en sp^3 , diversos estudios relacionan el FSP3 con la solubilidad^{61,62}.

- Punto isoelectrico: es el pH en el cual una molécula no está cargada⁶³.

- pKa: es el logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil⁶³.

- Refractividad molar: es la polarizabilidad de una mol de sustancia. Esta propiedad depende de la masa, índice de refracción y densidad^{64,65}.

- Superficie topológica polarizada (TPSA): es el área superficial de los átomos polares de una molécula, permite predecir la permeabilidad a membranas celulares; generalmente resultados de TPSA menores a 120\AA^2 indican permeabilidad^{64,65}.

- Volumen de Van der Waals: es el volumen basado en los valores que tome el radio de Van der Waals de los átomos que conforman una molécula^{58,66}.

Un estudio evaluó la capacidad de las propiedades fisicoquímicas QSAR de predecir la actividad antifúngicas de fenoles, entre ellos el eugenol, y encontró que a partir de la determinación *in silico* de estas propiedades es posible predecir la actividad anti-Candida de diversos compuestos fenólicos³².

Una de las herramientas informáticas más utilizadas para el cálculo *in silico* de las propiedades fisicoquímicas QSAR es el portal web ChemAxon, donde se puede encontrar una serie de softwares en línea para el cálculo de estas propiedades^{65,67}.

Citocromo P450

Los citocromos P450 son una familia de proteínas que contienen el grupo hemo y catalizan una serie de reacciones químicas como hidroxilación, desalquilación, epoxidación, desaminación, etc⁶⁸. Asimismo, estas proteínas están presentes en una amplia variedad de organismos como animales, plantas y hongos. Generalmente participan en la desintoxicación o eliminación de toxinas. En el ser humano participan en la biotransformación de drogas⁶⁸.

Los hongos utilizan los citocromos P450 para la degradación de xenobióticos y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los genes de citocromos P450, en hongos, suelen estar codificados por varios genes. En *Candida albicans* se han encontrado un total de 10 genes que codifican citocromos P450, siendo el mejor caracterizado el CYP51⁶⁸.

Para la predicción teórica del probable metabolismo de una droga, en presencia de un citocromo P450, se usan una serie de herramientas informáticas que permiten predecir el tipo de reacción química más probable, los átomos que participaran en dicha reacción y el producto formado. De esta manera es posible evaluar *in silico* la reactividad que tendrá y los posibles efectos que causará en el organismo donde actué. SMARTCyp y MetaPrint2D-React son algunos de los softwares más utilizados para predecir el metabolismo de una molécula en presencia de un citocromo P450^{69,70}.

Alternativamente se pueden usar otras herramientas informáticas para predecir el catabolismo de xenobióticos, en este caso catalizadas por otras enzimas, en microorganismos. EAWAG-BBD es un software que permite predecir el tipo de reacción química, los productos y las enzimas que pueden catalizar estas reacciones en microorganismos⁷¹.

III.- METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación que se adapta el presente trabajo es el observacional de tipo descriptivo.

3.2 Unidad teórica de análisis

Los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con aminoácidos, glutatión y poliaminas de *Candida albicans*.

3.3 Población de estudio

El presente estudio no presenta población de estudio.

3.4 Tamaño de la muestra

El presente estudio no presenta muestra de estudio.

3.5 Selección de la muestra

El presente estudio no presenta muestra de estudio.

3.6 Técnicas de recolección de datos

Para el diseño de las estructuras químicas en 2D y 3D se utilizó el *software* MolView⁷².

3.6.1 Determinación *in silico* de las propiedades fisicoquímicas del eugenol, epóxido de eugenol, quinona metilada, espermidina, espermina, de los aductos de epóxido de eugenol-glutatión, quinona metilada-glutatión, epóxido de eugenol-poliaminas y quinona metilada-poliaminas.

Los aductos de epóxido de eugenol-poliaminas de *Candida albicans* fueron los siguientes:

-Epóxido de eugenol- espermidina.

-Epóxido de eugenol-espermina.

Asimismo, los aductos quinona metilada-poliaminas fueron son los siguientes:

-Quinona metilada- espermidina (estructura 1)

-Quinona metilada- espermidina (estructura 2)

-Quinona metilada –espermina (estructura 1)

-Quinona metilada –espermina (estructura 2)

Para la determinación de estas propiedades fisicoquímicas se utilizaron los siguientes *softwares*:

1. Superficie topológica polarizada (TPSA): ChemAxon^{65,67}.
2. Refractividad molar: ChemAxon^{65,67}.
3. pKa: ChemAxon^{65,67}.
4. Punto isoeléctrico: ChemAxon^{65,67}.
5. Desplazamiento químico de núcleos atómicos del hidrógeno (¹H RMN): predictor 1D 1C NMR spectra^{73,74} y ChemAxon^{65,67}.
6. FSP3: ChemAxon^{65,67}.
7. $\Delta_f G^\circ$: Cheméo^{75,76}.
8. Volumen de Van der Waals: ChemAxon^{65,67}.
9. Área superficial de Van der Waals: ChemAxon^{65,67}.
10. Número de donantes de hidrógeno: ChemAxon^{65,67}.
11. Número de aceptores de hidrógeno: ChemAxon^{65,67}.
12. Log P: ChemAxon^{65,67}.

3.6.2 Determinación *in silico* de la reactividad del eugenol, epóxido de eugenol, quinona metilada, de los aductos de epóxido de eugenol-glutación, quinona metilada-glutación, epóxido de eugenol-poliaminas y quinona metilada-poliaminas.

1. Se determinó la energía de activación, SASA y score, de los átomos de carbono, frente al CYP2C (isoenzima del citocromo P450), del eugenol, quinona metilada y epóxido de eugenol, para lo cual se utilizó el *software* SMARTCyp versión 4.2.2^{69,70}.
2. Se determinaron productos del metabolismo del eugenol y epóxido de eugenol, utilizando el *software* MetaPrint2D-React^{69,70}.
3. Se determinaron productos del catabolismo del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada en microorganismos aeróbicos, utilizando el *software* EAWAG-BBD⁷¹.
4. Se determinaron productos del catabolismo del aducto de epóxido de eugenol-glutación y quinona metilada-glutación en microorganismos aeróbicos, utilizando el *software* EAWAG-BBD⁷¹.
5. Con respecto a los aductos de epóxido de eugenol-poliaminas y quinona metilada-poliaminas, se determinaron productos del catabolismo de estos aductos en microorganismos aeróbicos, utilizando el *software* EAWAG-BBD⁷¹.

3.6.3 Determinación *in silico* de las propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-aminoácidos y quinona metilada-aminoácidos

Los aductos de epóxido de eugenol-aminoácidos fueron los siguientes:

- Epóxido de eugenol-arginina
- Epóxido de eugenol-lisina
- Epóxido de eugenol-cisteína
- Quinona metilada-arginina
- Quinona metilada--lisina
- Quinona metilada--cisteína

Se determinaron las siguientes propiedades fisicoquímicas:

Se determinó la $\Delta_r G^\circ$ para lo cual se utilizó el método de Joback⁷⁶. Los cálculos se realizaron utilizando el *software* Cheméo^{75,76}.

3.6.4 Análisis e interpretación de la información

Los resultados fueron presentados en gráficos y tablas. Para el análisis estadístico se usó el coeficiente de correlación de Spearman de las relaciones lineales entre las siguientes variables⁷⁷:

- Energía de activación frente al área de superficie accesible por solvente (SASA), datos obtenidos mediante el *software* SMARTCyp.
- Media aritmética del desplazamiento químico de núcleos atómicos del hidrógeno (¹H RMN) frente a la energía de activación.
- Media aritmética del desplazamiento químico de núcleos atómicos del hidrógeno (¹H RMN) frente al área de superficie accesible por solvente (SASA).

Para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman se usó el *software* STATA 12.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 RESULTADOS

4.1.1 Propiedades fisicoquímicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

En la tabla 1 se puede observar los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas del eugenol y sus derivados; asimismo, en la tabla 2 puede observarse el pKa del grupo hidroxilo del eugenol y epóxido de eugenol.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

	Eugenol	Epóxido de eugenol	Quinona metilada
FSP3	0.20	0.40	0.10
TPSA	29.46 Å ²	41.99 Å ²	26.30 Å ²
Refractividad molar	48.79 cm ³ /mol	48.53 cm ³ /mol	51.80 cm ³ /mol
Donantes de hidrógeno	1	1	0
Aceptores de hidrógeno	2	3	2
Punto isoeléctrico	2.52	3.06	---
Log P	2.61	1.56	1.54
Volumen de Van der Waals	159.93 Å ³	164.89 Å ³	150.99 Å ³
Área superficial de Van der Waals	257.87 Å ²	278.72 Å ²	206.55 Å ²
Δ _r G°	-35.68 KJ/mol	-148.89 KJ/mol	21.48 KJ/mol

Tabla 2. pKa de los grupos químicos ionizables

Grupos químicos	Eugenol	Epóxido de eugenol
-OH (2)	9.94	10.16

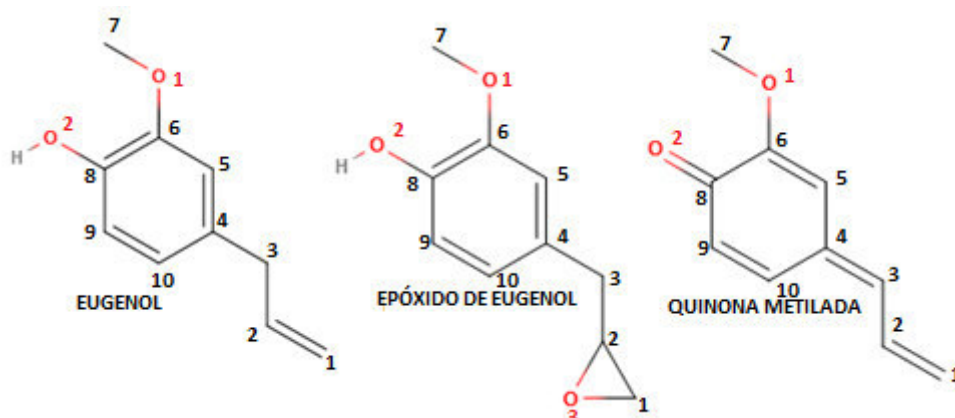


Figura 9. Estructura química del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

En la figura 9 se puede apreciar las estructuras químicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada; se asignó un número a cada átomo de carbono y oxígeno para su

mejor identificación. De la misma forma, en las figuras 10 y 11 pueden apreciarse las estructuras en 3D de los compuestos antes mencionados.

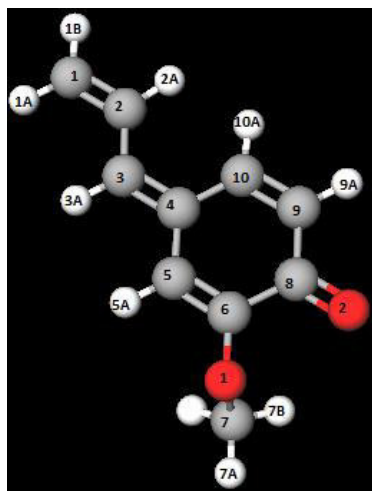


Figura 10. Estructura química en 3D del eugenol

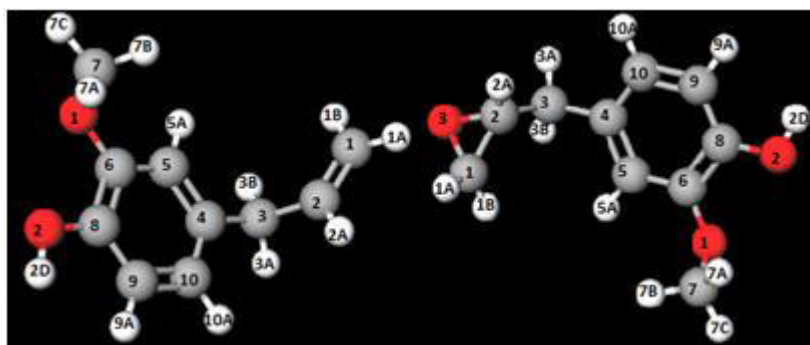


Figura 11. Estructura química en 3D del epóxido de eugenol y quinona metilada

En la tabla 3 puede observarse el desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada; además puede apreciarse los resultados obtenidos a partir de dos *softwares*.

Se puede observar que el pKa es ligeramente más elevado en el caso del epóxido de eugenol (tabla 2), por tanto, el grupo hidroxilo del eugenol puede ionizarse más fácilmente que el hidroxilo del epóxido de eugenol. Además, el Log P es ligeramente mayor en el eugenol (tabla 1), por lo que, el eugenol tendría un carácter más hidrofóbico. Los valores de TPSA indican que el eugenol y derivados pueden atravesar membranas biológicas. Sin embargo, el eugenol y quinona metilada poseen resultados similares; por lo, esta capacidad sería similar en ambos compuestos. Asimismo, el epóxido de eugenol tiene un $\Delta_r G^\circ$ más negativo que el eugenol y quinona metilada; por tanto, la formación del epóxido de eugenol es un proceso espontáneo.

Tabla 3. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Átomo de hidrógeno	Eugenol ChemAxon (ppm)	Eugenol predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Epóxido de eugenol ChemAxon (ppm)	Epóxido de eugenol predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada ChemAxon (ppm)	Quinona metilada predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)
1A	5.08	4.85	2.49	3.06	5.26	5.12
1B	5.09	4.85	2.77	3.11	5.08	4.99
2A	5.93	5.69	3.86	3.23	7.06	6.20
3A	3.33	3.13	3.18	2.86	6.44	6.21
3B	3.33	3.13	2.71	2.86	-----	-----
5A	6.66	6.59	6.12	6.58	6.36	6.86
7A	3.87	3.78	3.87	3.78	3.85	3.91
7B	3.87	3.78	3.87	3.78	3.85	3.91
7C	3.87	3.78	3.87	3.78	3.85	3.91
9A	6.65	6.63	6.78	6.63	6.59	6.85
10A	6.83	6.53	6.94	6.58	6.36	7.53

En la tabla 3 puede observarse que los átomos de hidrógeno unidos al carbono 7 tienen valores más bajos de ^1H RMN que en los hidrógenos unidos a carbonos hibridizados en sp^2 ; asimismo, el hidrógeno de quinona metilada unido al carbono 3 tienen un ^1H RMN más alto que en el caso del eugenol y quinona metilada.

4.1.2 Reactividad del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

4.1.2.1 Reactividad frente a CYP2C

En la tabla 4 se puede observar la energía de activación de cada átomo de carbono de las moléculas estudiadas. De la misma manera, en las tablas 5 y 6 puede observarse el SASA y el score de cada átomo de carbono, respectivamente.

Tabla 4. Energía de activación de los átomos de carbono

Átomo de carbono	Eugenol (KJ/mol)	Epóxido de eugenol (KJ/mol)	Quinona metilada (KJ/mol)
1	65.6	75.9	40.1
2	65.6	75.9	80.8
3	59.9	66.4	80.8
4	999	999	999
5	77.2	77.2	80.8
6	999	999	999
7	62.2	62.2	62.2
8	999	999	999
9	77.2	77.2	80.8
10	74.1	74.1	80.8

Tabla 5. Área de superficie accesible por solvente (SASA) de los átomos de carbono

Átomo de carbono	Eugenol (Å ²)	Epóxido de eugenol (Å ²)	Quinona metilada (Å ²)
1	62.46	52.42	61.01
2	29.01	17.76	28.21
3	28.14	28.04	22.92
4	4.06	3.67	5.82
5	23.39	22.57	22.90
6	5.19	5.19	7.09
7	64.33	64.33	65.80
8	6.22	6.22	7.49
9	28.6	28.6	28.09
10	27.46	26.64	26.97

Tabla 6. Score de los átomos de carbono

Átomo de carbono	Eugenol	Epóxido de eugenol	Quinona metilada
1	55.10	73.8	37.54
2	57.58	81.09	85.56
3	53.06	77.08	91.68
4	994.27	1016.55	1016.47
5	71.69	94	97.58
6	993.08	1010.59	1010.52
7	51.63	59.63	59.57
8	991.89	1004.65	1006.60
9	70.34	87.86	91.48
10	67.29	84.83	91.52

Como se observa en las tablas 4, 5 y 6, los carbonos 4,6,8 tienen alta energía de activación y una menor superficie de accesibilidad; por lo tanto, es poco probable que en estos carbonos se den reacciones catalizadas por el CYP2C. Sin embargo, los carbonos 1,2,3 y 7 tienen mejor energía de activación y mayor SASA; por lo tanto, las reacciones en estos carbonos son más probables.

4.1.2.2 Metabolismo del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada en microorganismos aeróbicos

En la figura 12 se puede apreciar la primera etapa del metabolismo del eugenol, predicha por el *software* EAWAG-BBD, en esta primera etapa se generan 3 compuestos, los cuales serán metabolizados en una segunda etapa (Figuras 13,14 y 15).

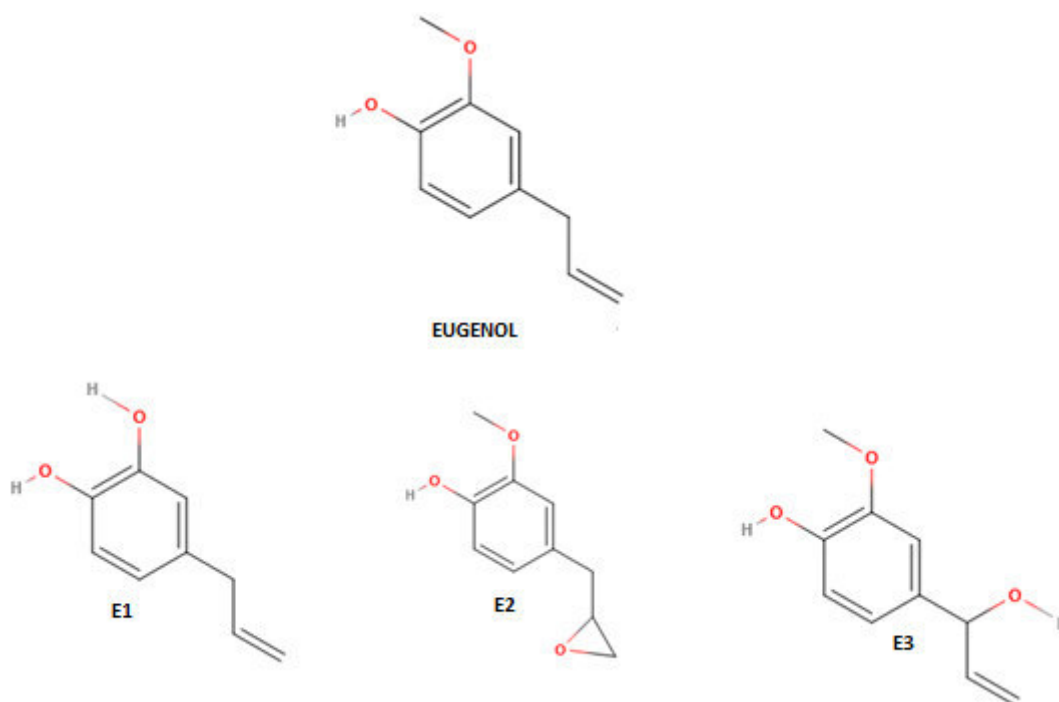


Figura 12. Primera etapa en el metabolismo del eugenol

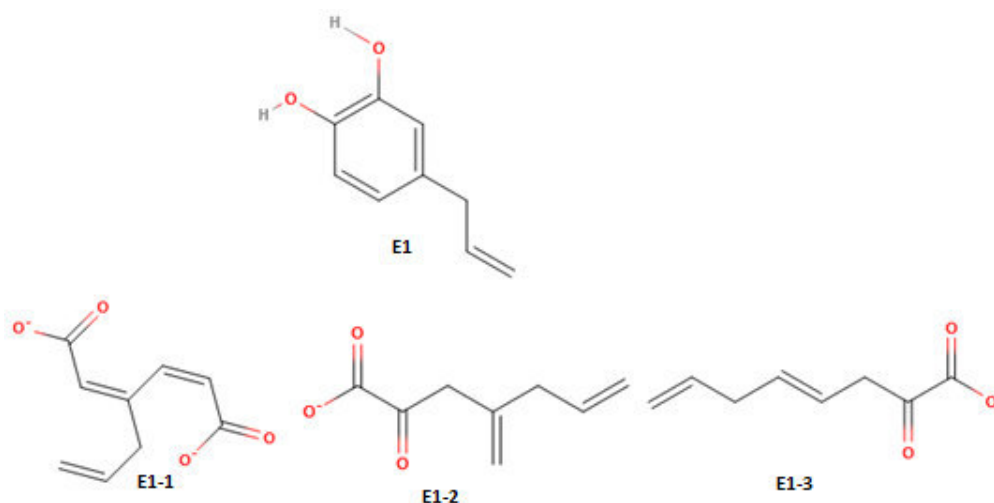


Figura 13. Metabolismo del compuesto E1

En la figura 12 puede observarse al epóxido de eugenol como uno de los productos predichos por el *software* EAWAG-BBD; por tanto, sería factible la epoxidación del eugenol en microorganismos aeróbicos. Asimismo, en la figura 14 se puede observar la apertura del anillo epóxido como una reacción probable, esto debido a que los grupos epóxidos suelen ser muy reactivos⁵⁰.

Se observa que las reacciones predichas por el *software* EAWAG-BBD en el eugenol ocurren en los carbonos 1,2,3 y 7; lo cual coincide con predicho por el *software* SMARTCyp.

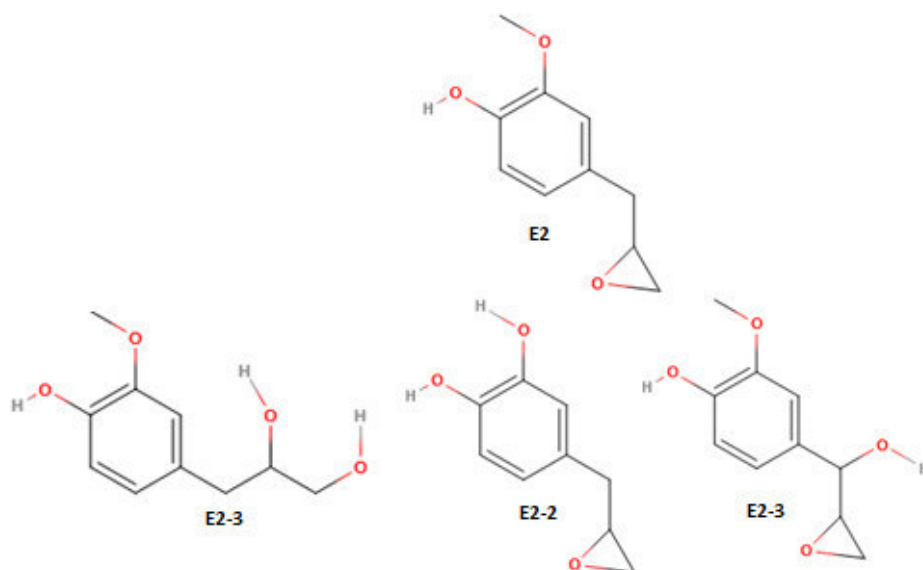


Figura 14. Metabolismo del compuesto E2

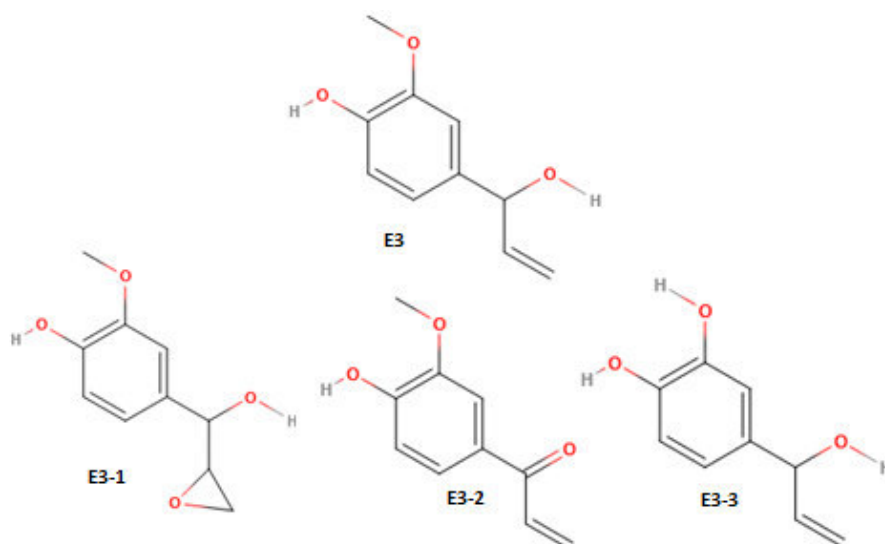


Figura 15. Metabolismo del compuesto E3

En la tabla 7 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos, predichos por el *software* EAWAG-BBD, del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Se observa que los carbonos 1,2 y 7 del epóxido de eugenol y quinona metilada, fueron predicho por el *software* EAWAG-BBD como sitios probables de reacción. Se observa que en todos los casos el grupo metino es susceptible a la epoxidación.

Tabla 7. Reacciones metabólicas del eugenol, epóxido de eugenol y quinona metilada

Eugenol	Epóxido de eugenol	Quinona metilada
O-desalquilación en el carbono 7 (E1)	O-desalquilación en el carbono 7 (P2)	O-desalquilación en el carbono 7 (Q1)
Epoxidación del grupo metino (E2)	Apertura del anillo epóxido (P1)	Epoxidación del grupo metino de los carbonos 1 y 2 (Q2)
Hidroxilación en el carbono 2 (E3)	Hidroxilación en el carbono 2 (P3)	Transferencia de un átomo de oxígeno, formándose un grupo éter entre los carbonos 6 y 8 (Q3)

En la tabla 8 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos, predichos por el *software* EAWAG-BBD, de los derivados del eugenol; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 8. Reacciones metabólicas de compuestos derivados del eugenol, puede observarse entre paréntesis el producto de cada reacción

Compuesto E1	Compuesto E2	Compuesto E3
Escisión del anillo aromático, transferencia de dos átomos de oxígeno a los carbonos 6 y 8, oxidación de los grupos hidroxilo (E1-1)	Apertura del anillo epóxido (E2-1)	Epoxidación del grupo alqueno (E3-1)
Escisión del anillo aromático, transferencia de un átomo de oxígeno al carbono 8, oxidación de los grupos hidroxilo, pérdida de un grupo metileno (carbono 9) (E1-2)	O-desalquilación en el carbono 7 (E2-2)	O-desalquilación en el carbono 7 (E3-3)
Escisión del anillo aromático, transferencia de un átomo de oxígeno al carbono 6, oxidación de los grupos hidroxilo, pérdida de un grupo metileno (carbono 5) (E1-3)	Hidroxilación en el carbono 2 (E2-3)	Oxidación del grupo hidroxilo unido al carbono 3 (E3-2)

En las tablas 7 y 8 puede observarse que la O-desalquilación en el carbono 7 es un proceso probable, además, el producto de esta reacción sería un grupo hidroxilo; lo cual le conferiría mayor capacidad para formar interacciones hidrofílicas.

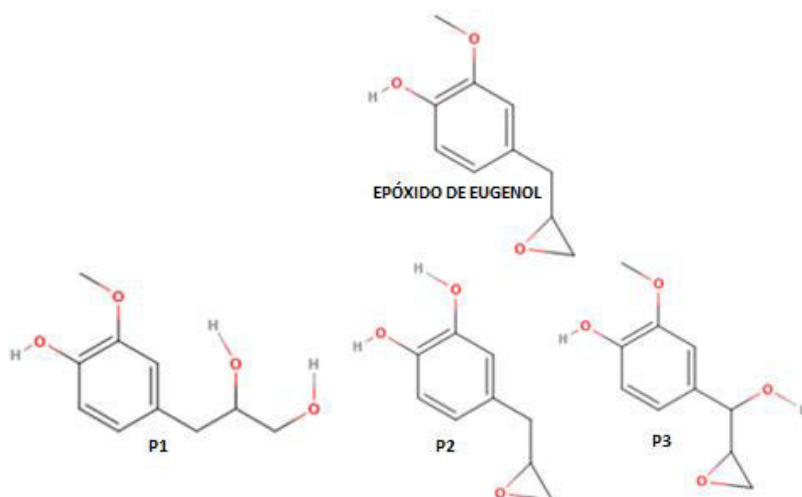


Figura 16. Primera etapa en el metabolismo del epóxido de eugenol

En la figura 16 se puede apreciar la primera etapa del metabolismo del epóxido eugenol, predicha por el *software* EAWAG-BBD, en esta primera etapa se generan 3 compuestos, los cuales serán metabolizados en una segunda etapa (Figuras 17,18 y 19).

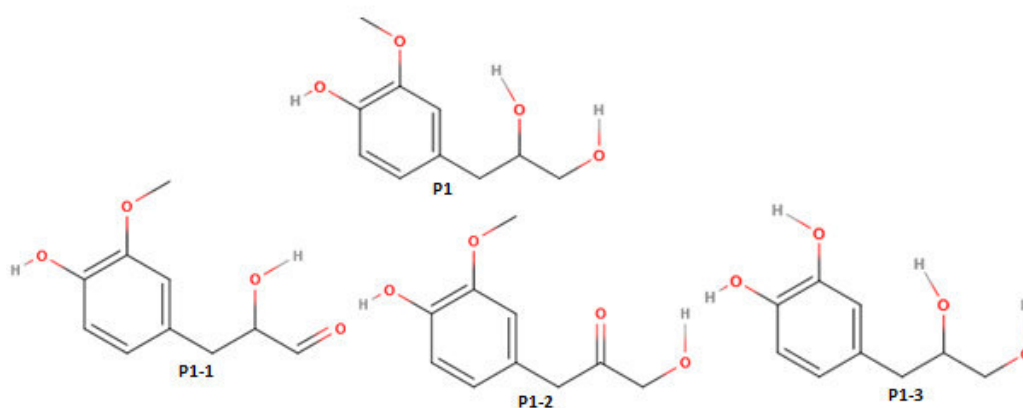


Figura 17. Metabolismo del compuesto P1

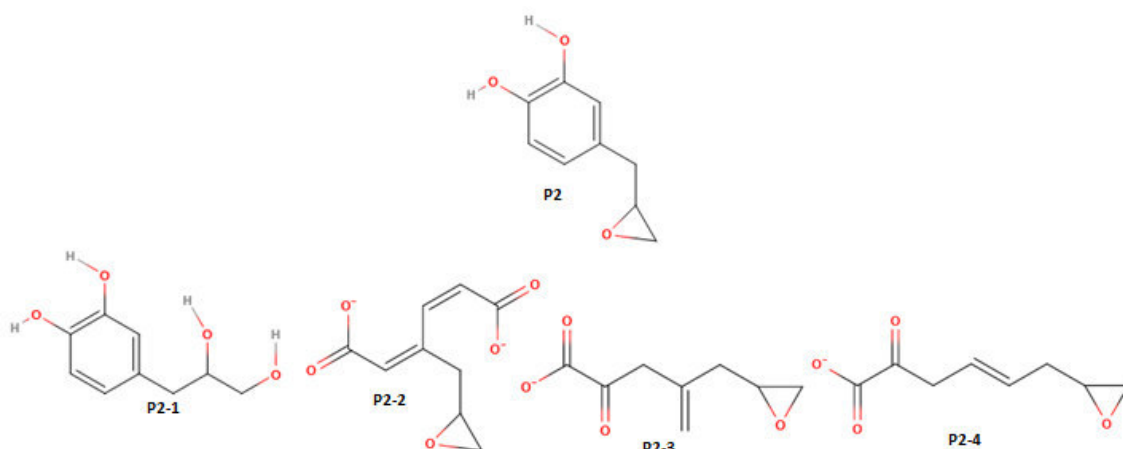


Figura 18. Catabolismo del compuesto P2

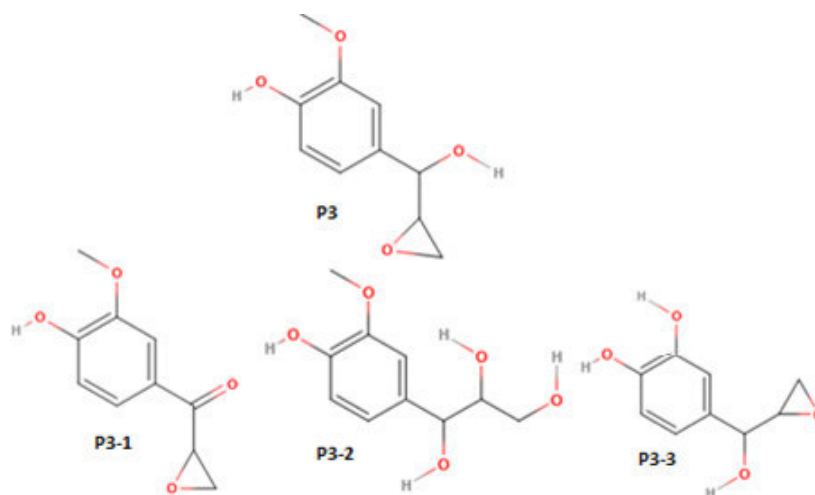


Figura 19. Catabolismo del compuesto P3

En la tabla 9 se detallan los mecanismos por el cuales se obtienen los productos metabólicos, predichos por el *software* EAWAG-BBD, de los derivados del epóxido de eugenol; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 9. Reacciones catabólicas de compuestos derivados de epóxido de eugenol

Compuesto P1	Compuesto P2	Compuesto P3
Oxidación del grupo hidroxilo unido al carbono 1 (P1-1)	Apertura del anillo epóxido (P2-1)	Apertura del anillo epóxido (P3-2)
Oxidación del grupo hidroxilo unido al carbono 2 (P1-2)	Escisión del anillo aromático, transferencia de dos átomos de oxígeno a los carbonos 6 y 8, oxidación de los grupos hidroxilo (P2-2)	Oxidación del grupo hidroxilo unido al carbono 3 (P3-1)
O-desalquilación en el carbono 7 (P1-3)	Escisión del anillo aromático, transferencia de un átomo de oxígeno al carbono 8, oxidación de los grupos hidroxilo, pérdida de un grupo metileno (carbono 9) (P2-3)	O-desalquilación en el carbono 7 (P3-3)
	Escisión del anillo aromático, transferencia de un átomo de oxígeno al carbono 6, oxidación de los grupos hidroxilo, pérdida de un grupo metileno (carbono 5) (P2-4)	

En la figura 16 se puede observar que los carbonos 1,2,3 y 7 participan en las reacciones predichas por el *software* EAWAG-BBD. Además, en las figuras 17,18 y 19 se observa que los grupos hidroxilo unidos a los carbonos 1 y 2 pueden oxidarse y formar grupos carbonilo

En la figura 20 se puede apreciar la primera etapa del catabolismo de quinona metilada, predicha por el *software* EAWAG-BBD, en esta primera etapa se generan 3 compuestos, los cuales serán metabolizados en una segunda etapa (Figuras 21,22 y 23).

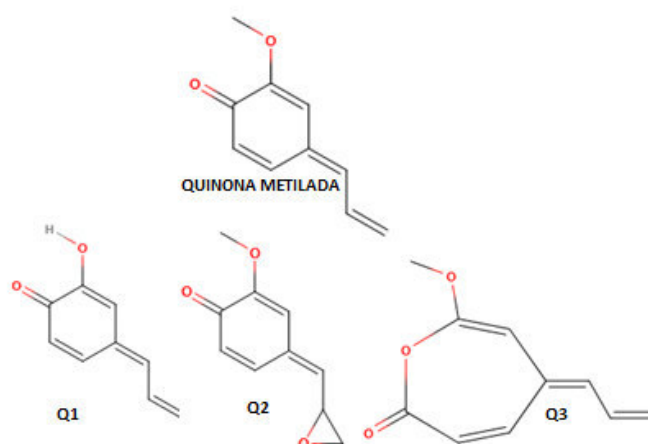


Figura 20. Primera etapa en el catabolismo de quinona metilada

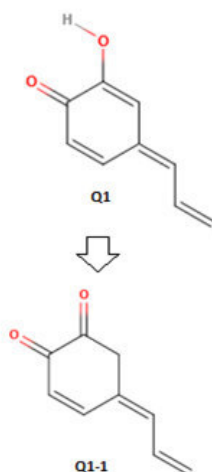


Figura 21. Catabolismo del compuesto Q1

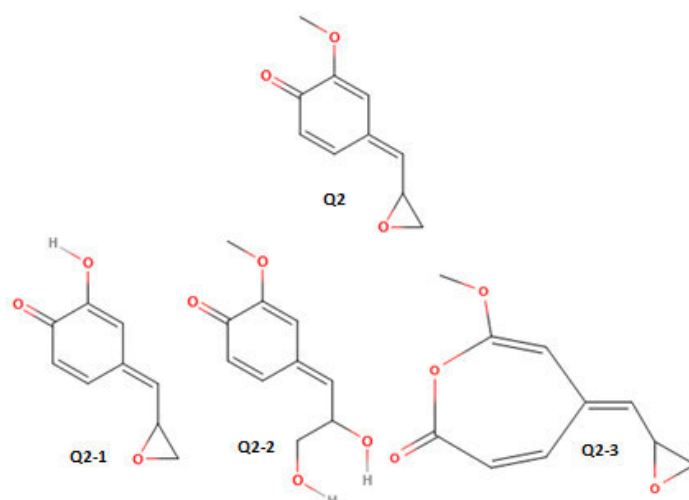


Figura 22. Catabolismo del compuesto Q2

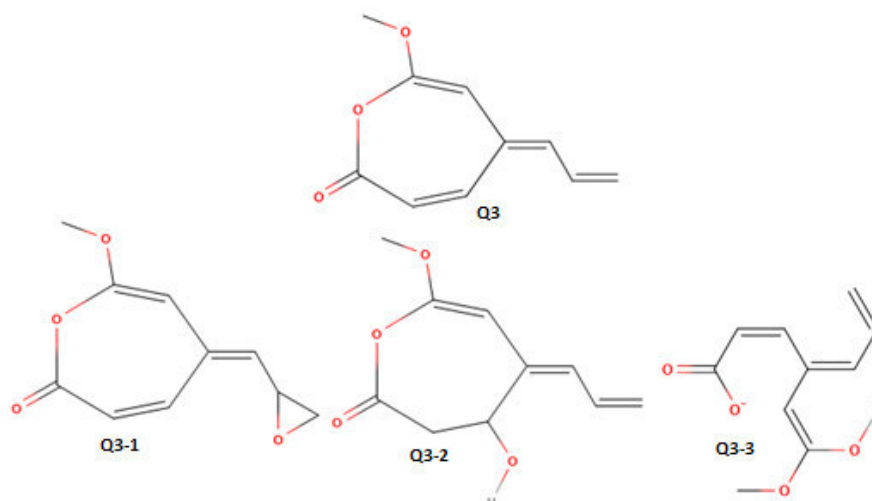


Figura 23. Catabolismo del compuesto Q3

En la tabla 10 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos, predichos por el *software* EAWAG-BBD, de los derivados de quinona metilada; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Como se observa en las figuras 20 y 22, la transferencia de un átomo de oxígeno entre los carbonos 6 y 8 para formar un grupo éter es un proceso probable. Además, el grupo metino en los carbonos 1 y 2 es susceptible a la epoxidación.

Tabla 10. Reacciones catabólicas de compuestos derivados de quinona metilada

Compuesto Q1	Compuesto Q2	Compuesto Q3
Oxidación del grupo hidroxilo (Q1-1)	O-desalquilación en el carbono 7 (Q2-1)	Epoxidación del grupo metino de los carbonos 1 y 2 (Q3-3)
	Apertura del anillo epóxido (Q2-2)	Hidroxilación en el carbono 10 (Q3-2)
	Transferencia de un átomo de oxígeno, formándose un grupo éter entre los carbonos 6 y 8 (Q2-3)	Escisión del anillo aromático, transferencia de un átomo de oxígeno al carbonos 8 (Q3-3)

4.1.2.3 Metabolismo del eugenol y epóxido de eugenol, catalizado por el citocromo P450

En las figuras 24 y 25 se puede observar los productos del metabolismo del eugenol, predichos por el *software* MetaPrint2D-React, catalizado por el citocromo P450; se le asignó un símbolo a cada compuesto para su identificación.

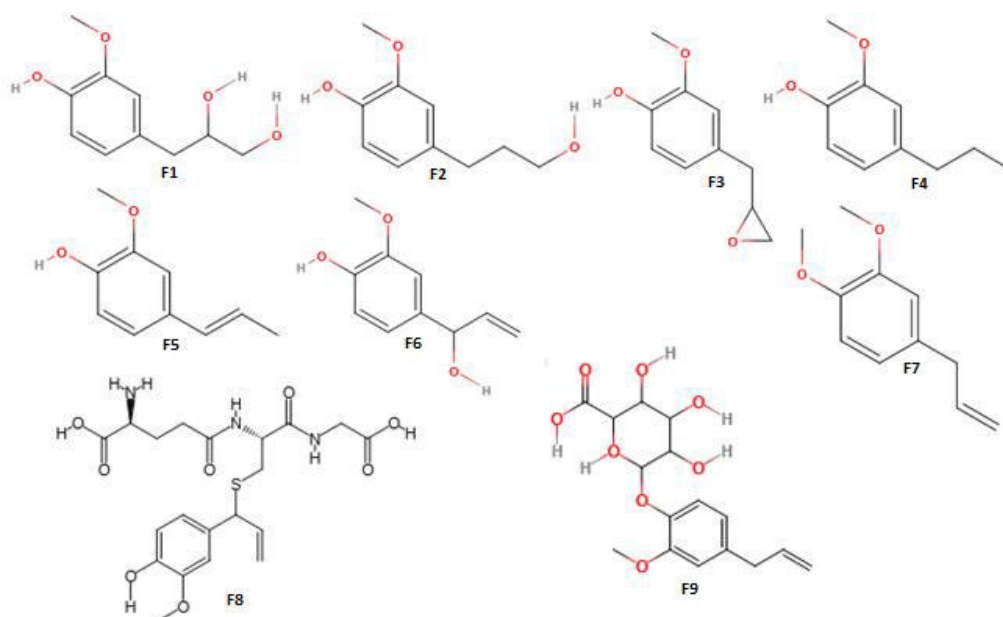


Figura 24. Productos del metabolismo del eugenol

En las figuras 24, 25, 26 y 27 se observa que la mayoría de las reacciones en eugenol y epóxido de eugenol ocurren en los carbonos 1,2,3 y 7; asimismo, la epoxidación del grupo metino en eugenol y la apertura del anillo epóxido en epóxido de eugenol son procesos probables y pueden ser catalizadas por el citocromo P450.

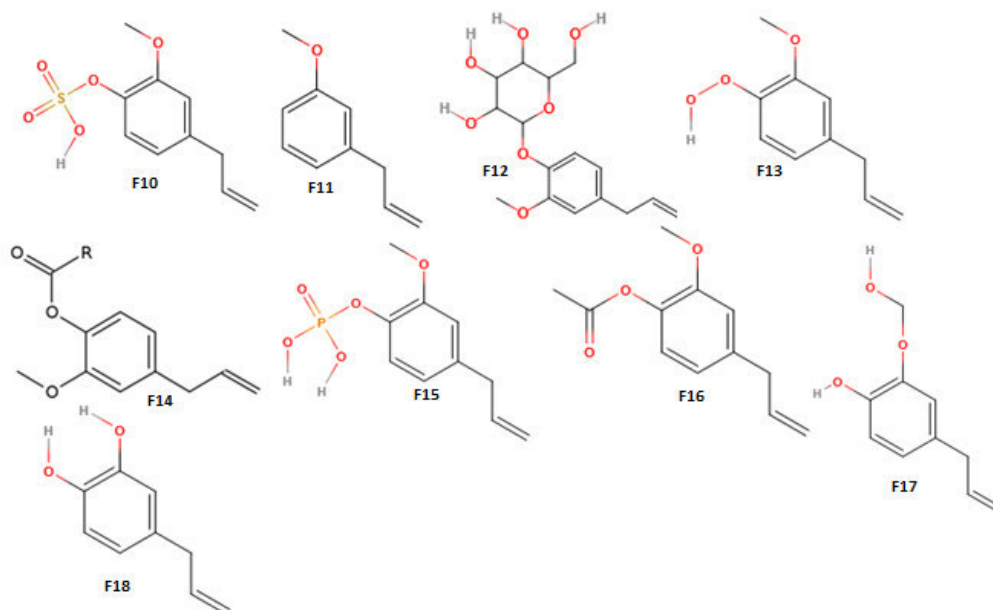


Figura 25. Productos del metabolismo del eugenol

En las figuras 26 y 27 se puede observar los productos del metabolismo del epóxido de eugenol, predichos por el *software* MetaPrint2D-React, catalizado por el citocromo P450; se le asignó un símbolo a cada compuesto para su identificación.

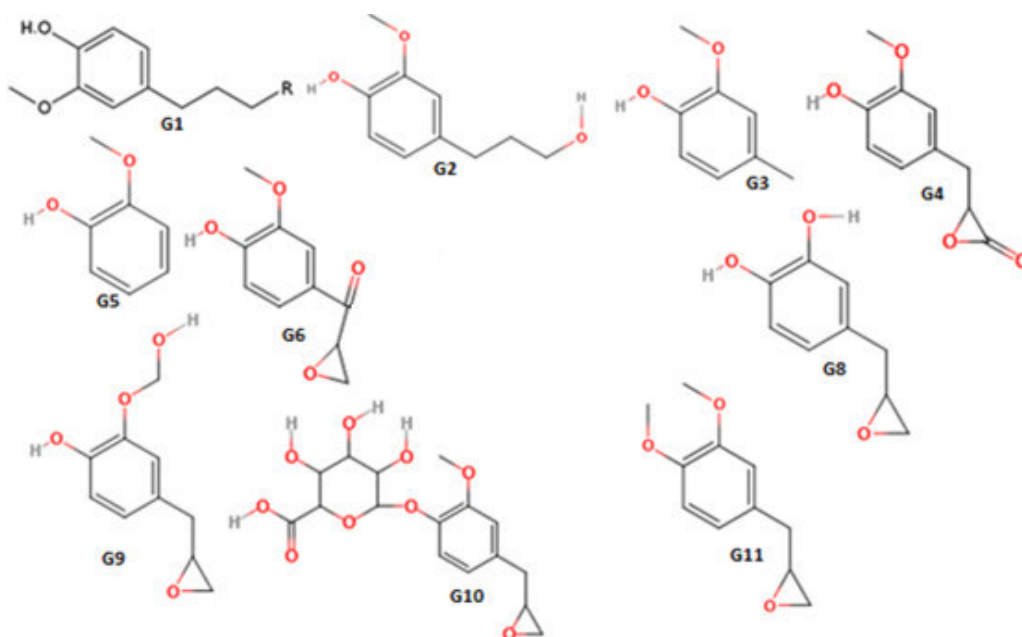


Figura 26. Productos del metabolismo del epóxido de eugenol

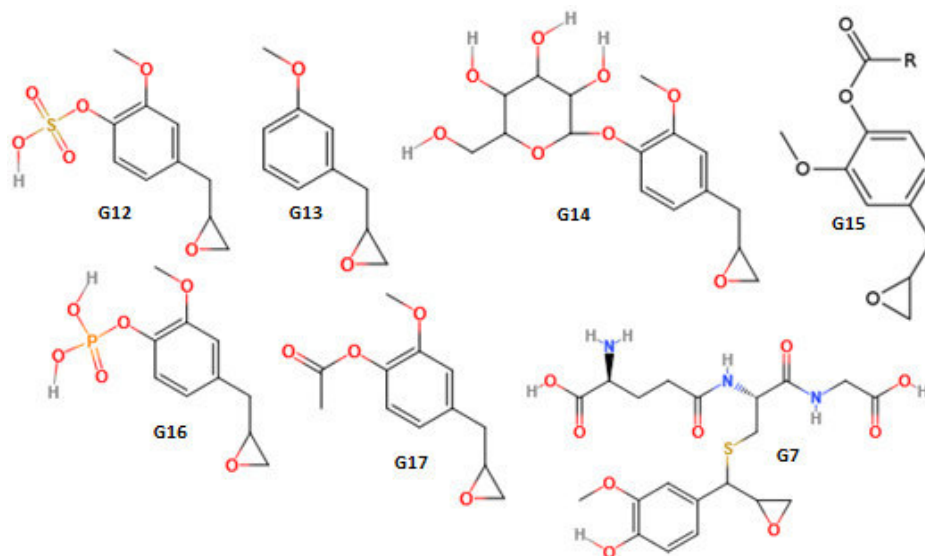


Figura 27. Productos del metabolismo del epóxido de eugenol

En la tabla 11 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos, predichos por el *software* MetaPrint2D-React, de los derivados del eugenol y epóxido de eugenol; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 11. Reacciones metabólicas catalizadas por citocromo P450

Eugenol	Epóxido de eugenol
Epoxidación del grupo metino de los carbonos 1 y 2, apertura del anillo epóxido (F1)	Apertura del anillo epóxido, deshidroxilación, unión de un radical R (G1)
Hidroxilación en el carbono 1 (F2)	Hidroxilación en el carbono 1 (G2)
Epoxidación del grupo metino de los carbonos 1 y 2 (F3)	Desalquilación en el carbono 3 (G3)
Reducción del grupo metino (F4)	Adición de un átomo de oxígeno al carbono 1, formación de un grupo cetona (G4)
Tautomerización del grupo metino (F5)	Desalquilación en el carbono 4 (G5)
Hidroxilación en el carbono 3 (F6)	Adición de un átomo de oxígeno al carbono 3, formación de un grupo cetona (G6)
Metilación en el oxígeno 2 (F7)	Glutathionización en el carbono 3 (G7)
Glutathionización en el carbono 3 (F8)	O-desalquilación en el carbono 7 (G8)
Glucoronidación en el oxígeno 2 (F9)	Hidroxilación en el carbono 7 (G9)
Sulfatación en el oxígeno 2 (F10)	Glucoronidación en el oxígeno 2 (G10)
Deshidroxilación en el carbono 8 (F11)	Metilación en el oxígeno 2 (G11)
Adición de una galactosa en el oxígeno 2 (F12)	Sulfatación en el oxígeno 2 (G12)
Hidroxilación en el oxígeno 2, formación de un grupo peróxido (F13)	Deshidroxilación en el carbono 8 (G13)
Acilación en el oxígeno 2 (F14)	Adición de una galactosa en el oxígeno 2 (G14)
Fosforilación en el oxígeno 2 (F15)	Acilación en el oxígeno 2 (G15)
Acetilación en el oxígeno 2 (F16)	Fosforilación en el oxígeno 2 (G16)
Hidroxilación en el carbono 7 (F17)	Acetilación en el oxígeno 2 (G17)
O-desalquilación en el carbono 7 (F18)	

4.1.3 Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión

En la tabla 12 se puede observar los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión; asimismo, en la tabla 13 puede observarse el pKa de los grupos químicos ionizables.

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada

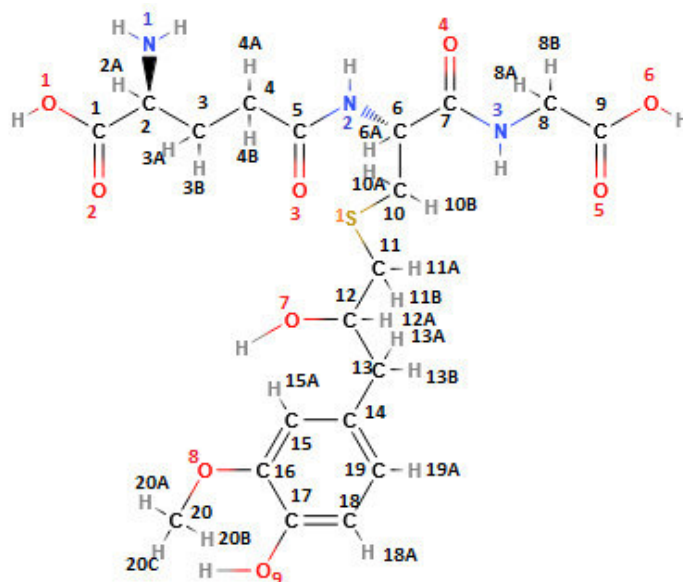
	Epóxido de eugenol-glutatión	Quinona metilada-glutatión (estructura 1)	Quinona metilada-glutatión (estructura 2)
FSP3	0.50	0.40	0.40
TPSA	208.51 Å ²	188.28 Å ²	188.28 Å ²
Refractividad molar	117.74 cm ³ /mol	117.19 cm ³ /mol	115.75 cm ³ /mol
Donantes de hidrógeno	7	6	6
Aceptores de hidrógeno	10	9	9
Punto isoeléctrico	2.70	2.79	2.71
Log P	-3.85	-2.72	-2.66
Volumen de Van der Waals	425.84 Å ³	409.34 Å ³	409.86 Å ³
Área superficial de Van der Waals	661.69 Å ²	644.25 Å ²	638.78 Å ²
Δ _f G°	-694.43 KJ/mol	-474.95 KJ/mol	-469.77 KJ/mol

Tabla 13. pKa de los grupos químicos ionizables

Grupos químicos	Epóxido de eugenol-glutatión	Quinona metilada-glutatión (estructura 1)	Quinona metilada-glutatión (estructura 2)
-OH (1)	1.81	1.81	1.80
-OH (6)	3.60	3.78	3.63
-OH (7)	14.69	10.08	----
-NH ₂ (1)	9.25	9.23	9.22
-NH (2)	12.32	12.34	12.43
-NH (3)	15.38	15.26	14.55
-OH (8)	----	----	10.02
-OH (9)	10.16	----	----

En las figuras 28, 29 y 30 se puede apreciar las estructuras químicas de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada glutatión; se asignó un número a cada átomo de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno para su mejor identificación.

En la tabla 12 se observa que la formación del aducto epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión son procesos espontáneos; asimismo, a un pH fisiológico estos aductos se presentan como moléculas cargadas, ya que su punto isoeléctrico es menor 7. Además, todos estos aductos presentan donantes y aceptores de hidrógeno; por lo que podrían formar puentes de hidrógeno. Estas propiedades les conferirían un carácter hidrofílico. En la tabla 13 se observa el pKa de los grupos ionizables, se observa que estos aductos presentan grupos químicos que pueden ionizarse a un amplio rango de pH.

**Figura 28.** Estructura del aducto epóxido de eugenol-glutatión

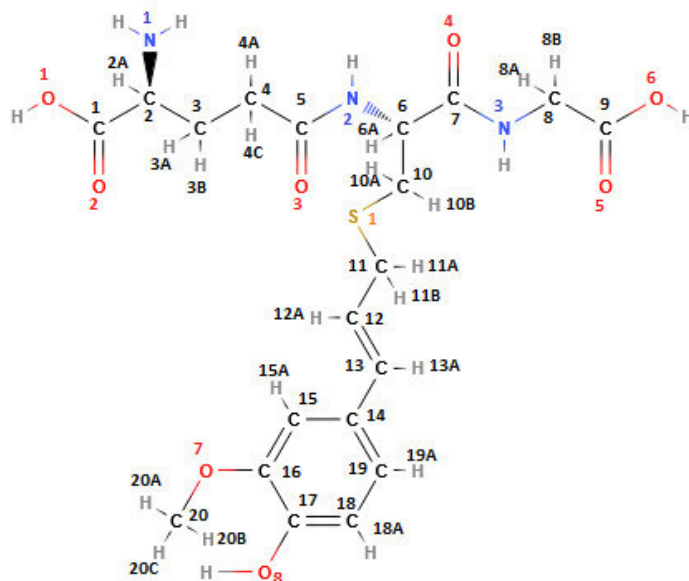


Figura 29. Estructura del aducto quinona metilada-glutati3n (estructura 1)

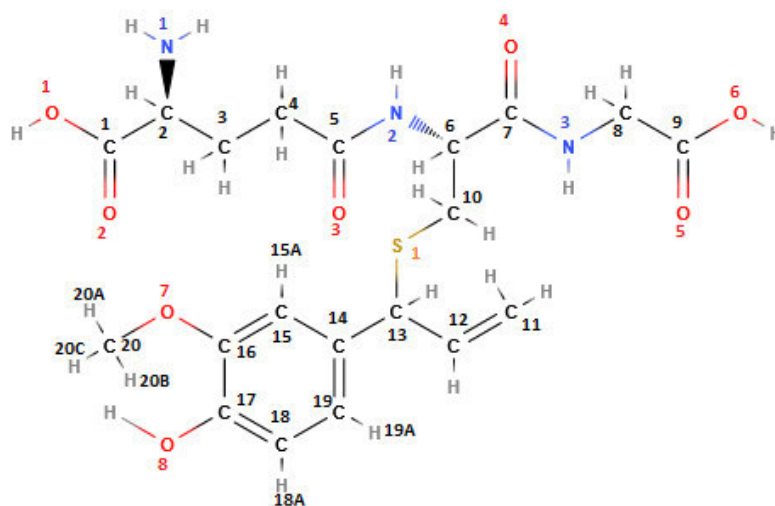


Figura 30. Estructura del aducto quinona metilada-glutati3n (estructura 2)

En la tabla 14 puede observarse el desplazamiento qu3mico de los 3tomos de hidr3geno de aductos de ep3xido de eugenol-glutati3n y quinona metilada-glutati3n; adem3s puede apreciarse los resultados obtenidos a partir de dos *softwares*.

Tabla 14. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

	Epóxido de eugenol-glutación ChemAxon (ppm)	Epóxido de eugenol-glutación predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-glutación (estructura 1) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-glutación predictor (estructura 1) 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-glutación (estructura 2) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-glutación (estructura 2) predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)
2A	4.18	3.45	4.18	3.45	4.18	3.45
3A	2.04	1.91	2.04	1.91	2.04	1.91
3B	2.50	1.91	2.50	1.91	2.50	1.91
4A	1.96	2.30	1.96	2.30	1.96	2.30
4B	2.51	2.30	2.51	2.30	2.51	2.30
6A	4.36	4.40	4.30	4.40	4.40	4.42
8A	3.84	3.75	3.84	3.75	3.84	3.75
8B	3.85	3.75	3.85	3.75	3.85	3.75
10A	2.70	3.03	2.84	3.03	2.99	3.04
10B	2.99	3.03	2.93	3.03	3.08	3.04
11A	3.08	2.93	3.04	2.97	4.93	5.01
11B	2.50	2.93	3.36	2.97	4.93	5.04
12A	4.21	3.88	6.22	6.83	6.03	6.68
13A	2.75	2.62	6.29	6.40	4.66	4.70
13B	2.75	2.62	-----	-----	-----	-----
15A	6.12	6.61	7.14	7.11	6.88	7.00
18A	6.78	6.63	6.80	6.69	6.82	6.68
19A	6.60	6.51	7.00	7.40	7.53	6.71
20A	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
20B	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
20C	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79

En la tabla 14 puede observarse que los átomos de hidrógeno unidos a los carbonos 15,18 y 19 tienen valores más altos de ^1H RMN que en los hidrógenos unidos a carbonos hibridizados en sp^3 ; asimismo, los hidrógenos de los aductos de quinona metilada unidos a los carbonos 12 y 13 tienen valores de ^1H RMN más altos que en el caso del aducto de epóxido de eugenol.

4.1.4 Reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-glutación y quinona metilada-glutación

En las figuras 31, 32 y 33 se pueden apreciar los productos del catabolismo de aductos de epóxido de eugenol-glutación y quinona metilada-glutación en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

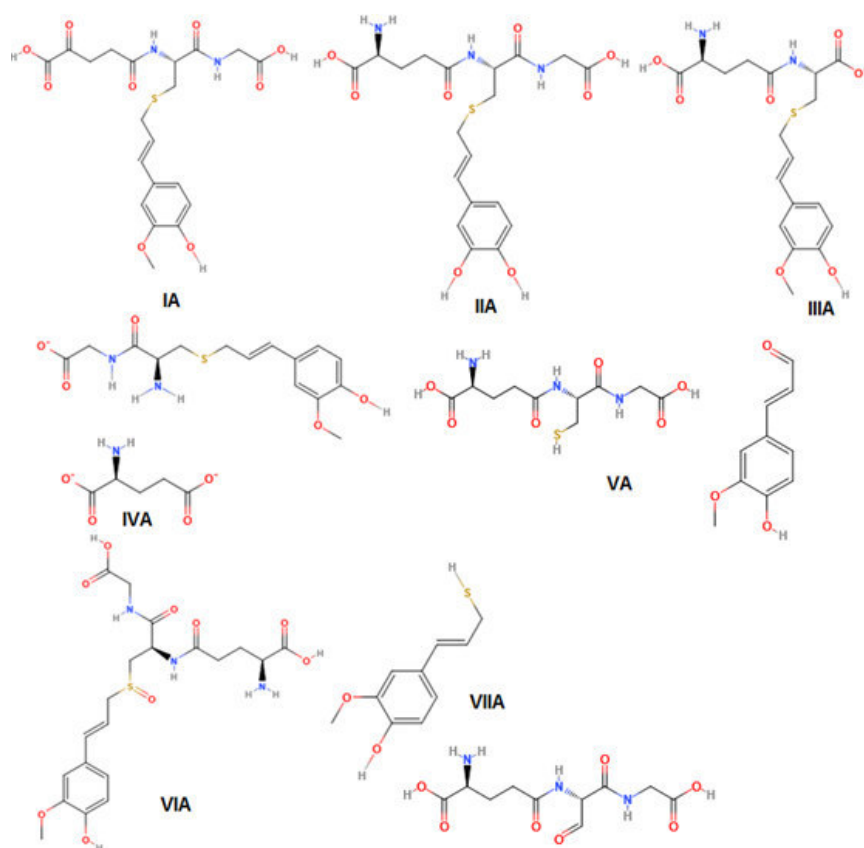


Figura 31. Productos del catabolismo del aducto de quinona metilada-glutatión (estructura 1)

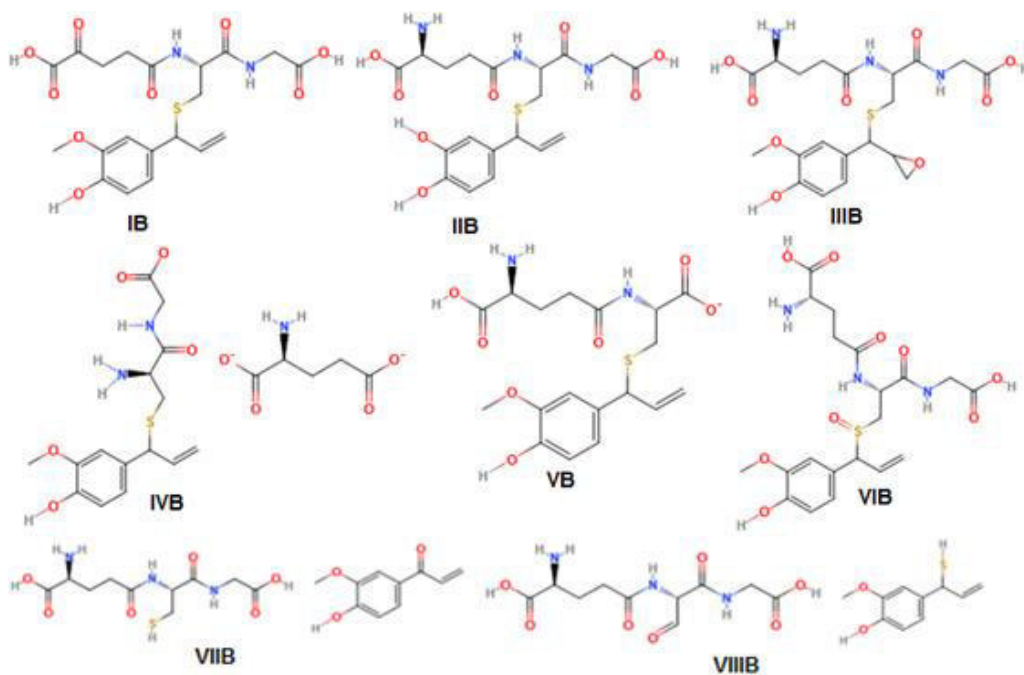


Figura 32. Productos del catabolismo del aducto de quinona metilada-glutatión (estructura 2)

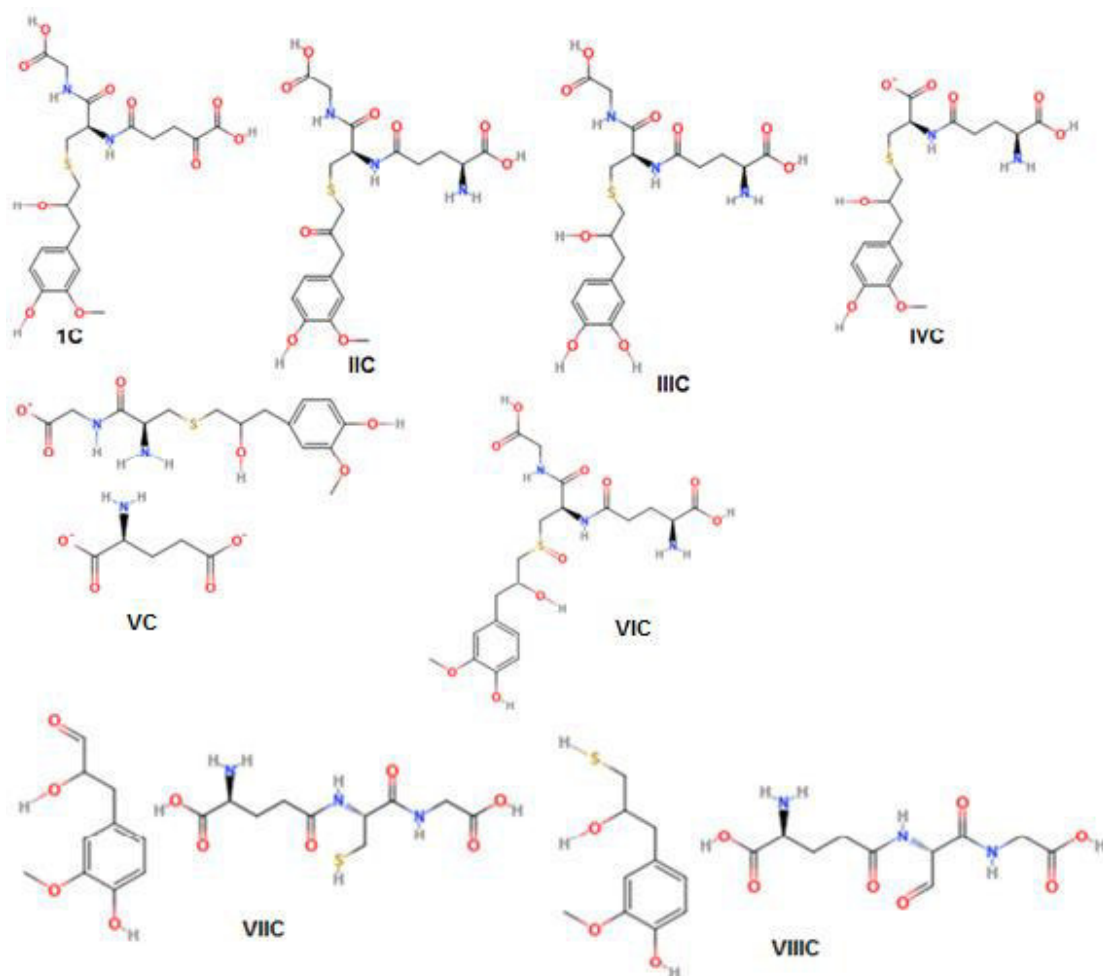


Figura 33. Productos del catabolismo del aducto de epóxido de eugenol-glutatión

En la tabla 15 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 15. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión

Epóxido de eugenol-glutatión	Quinona metilada-glutatión (estructura 1)	Quinona metilada-glutatión (estructura 2)
Desanimación oxidativa en el carbono 2 (IC).	Desanimación oxidativa en el carbono 2 (IA).	Desanimación oxidativa en el carbono 2 (IB).
O-desalquilación en el carbono 20 (IIIC).	O-desalquilación en el carbono 20 (IIA).	O-desalquilación en el carbono 20 (IIB)
Desanimación oxidativa en el carbono 7 (IVC).	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (IIIA).	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (VB).
N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (VC).	N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (IVA).	N-desalquilación oxidativa en el carbono 5 (IVB).
S-desalquilación oxidativa en el carbono 11 (VIIC).	S-desalquilación oxidativa en el carbono 11 (VA).	S-desalquilación oxidativa en el carbono 13 (VIIB).
S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIIC).	S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIIA).	S-desalquilación oxidativa en el carbono 10 (VIIB).
Oxidación del azufre a sulfóxido (VIC).	Oxidación del azufre a sulfóxido (VIA).	Oxidación del azufre a sulfóxido (VIB).
Oxidación del grupo hidroxilo en el oxígeno 7 (IIC).	-----	Epoxidación del grupo metino (IIIB).

En la tabla 15 se observa que las reacciones de desaminación oxidativa, O-desalquilación, N-desalquilación oxidativa, S-desalquilación oxidativa y oxidación de azufre a sulfóxido son las reacciones metabólicas más probables en aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con glutatión, que podrían darse en microorganismos aeróbicos.

4.1.5 Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con aminoácidos

En las figuras 34, 35 y 36 se puede apreciar las estructuras químicas de aductos de epóxido de eugenol-cisteína, quinona metilada-cisteína (estructura 1) y quinona metilada-cisteína (estructura 2). De igual forma, se aprecia el valor de la variación de la energía libre de Gibbs de formación. Se puede observar que estos aductos presentan una $\Delta_f G$ negativa, por lo que, podrían formarse espontáneamente. Sin embargo, el aducto de epóxido de eugenol-cisteína presenta un valor más negativo, lo cual podría deberse a que las reacciones de apertura de los grupos epóxidos son más probables y a la elevada reactividad de estos grupos⁵⁰.

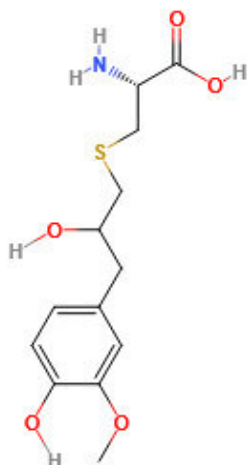


Figura 34. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-cisteína. $\Delta_f G^\circ = -406.13$ KJ/mol

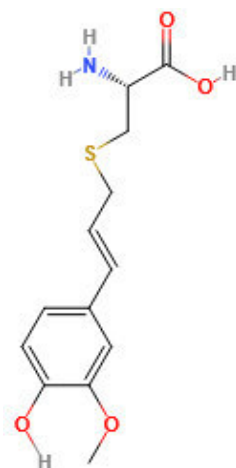


Figura 35. Estructura química del aducto de quinona metilada-cisteína (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = -186.65$ KJ/mol

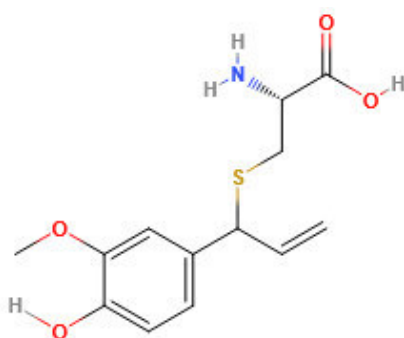


Figura 36. Estructura química del aducto de quinona metilada-cisteína (estructura 2). $\Delta_f G^\circ = -181.47$ KJ/mol

En las figuras 37, 38 y 39 se puede apreciar las estructuras químicas de los aductos de epóxido de eugenol-lisina, quinona metilada-lisina (estructura 1) y quinona metilada-lisina (estructura 2). De igual forma, se aprecia el valor de la variación de la energía libre de Gibbs de formación. Se puede notar que estos aductos pueden formarse espontáneamente, ya que su $\Delta_f G$ es negativa. Además, la formación del aducto epóxido

de eugenol-lisina es termodinámicamente más favorable que los aductos de quinona metilada, ya que tiene un $\Delta_f G^\circ$ más negativo.

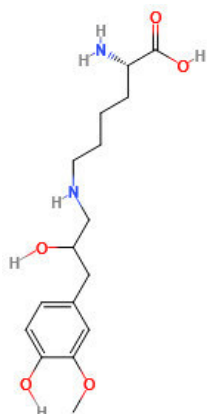


Figura 37. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-lisina. $\Delta_f G^\circ = -324.60$ KJ/mol

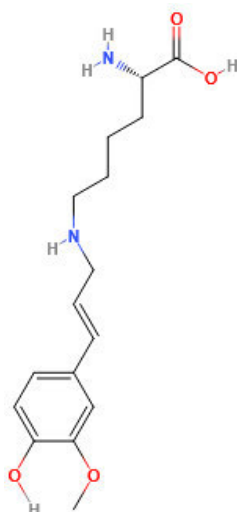


Figura 38. Estructura química del aducto de quinona metilada-lisina (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = -105.12$ KJ/mol

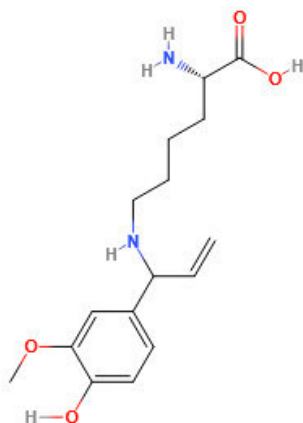


Figura 39. Estructura química del aducto de quinona metilada-lisina (estructura 2). $\Delta_f G^\circ = -99.94$ KJ/mol

En las figuras 40, 41 y 42 se puede apreciar las estructuras químicas de los aductos de epóxido de eugenol-arginina, quinona metilada-arginina (estructura 1) y quinona metilada-arginina (estructura 2). De igual forma, se aprecia el valor de la variación de la energía libre de Gibbs de formación.

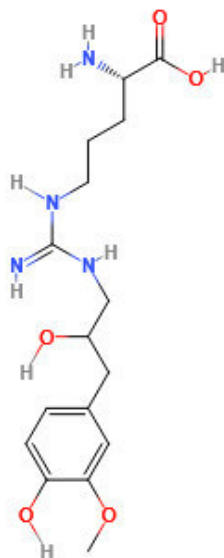


Figura 40. Estructura química del aducto de epóxido de eugenol-arginina. $\Delta_f G^\circ = -31.61$ KJ/mol

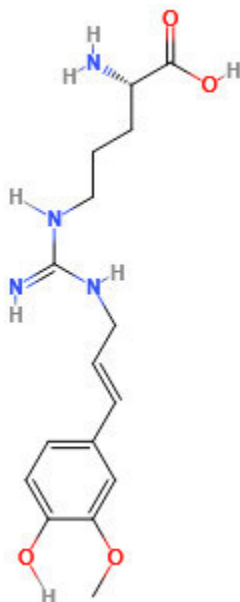


Figura 41. Estructura química del aducto de quinona metilada-arginina (estructura 1). $\Delta_f G^\circ = 187.87$ KJ/mol

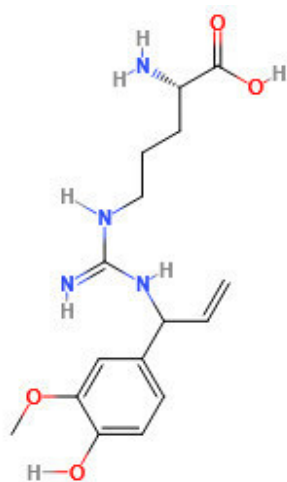


Figura 42. Estructura química del aducto de quinona metilada-arginina (estructura 2).
 $\Delta_f G^\circ = 193.05 \text{ KJ/mol}$

En las figuras 40,41 y 42 se observa que la formación del aducto epóxido de eugenol-arginina es espontaneo; sin embargo, la formación de los aductos de quinona metilada-arginina no sería un proceso espontaneo, debido a que su $\Delta_f G$ es positivo.

4.1.6 Propiedades fisicoquímicas de la espermina y espermidina

En la tabla 16 se puede observar las propiedades fisicoquímicas de la espermidina y espermina; asimismo, en las figuras 43 y 44 se puede apreciar las estructuras químicas de estas moléculas.

Tabla 16. Propiedades fisicoquímicas de la espermina y espermidina

	Espermina	Espermidina
FSP3	1.0	1.0
TPSA	76.10 Å ²	64.07 Å ²
Refractividad molar	62.56 cm ³ /mol	44.97 cm ³ /mol
Donantes de hidrógeno	4	3
Aceptores de hidrógeno	4	3
Punto isoeléctrico	----	----
Log P	-1.45	-1.15
Volumen de Van der Waals	229.87 Å ³	166.44 Å ³
Área superficial de Van der Waals	408.16 Å ²	295.73 Å ²
$\Delta_f G^\circ$	345 KJ/mol	230.35 KJ/mol

En la tabla 16 puede observarse que espermina y espermidina tienen grupos químicos que pueden donar o aceptar átomos de hidrógeno; por lo que, podrían formar puentes de hidrógeno. Además, poseen un TPSA menor a 120 Å², por tanto, podrían atravesar membranas biológicas.

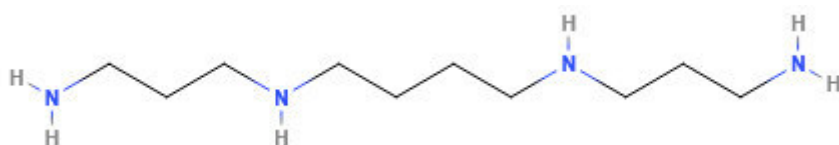


Figura 43. Estructura química de la espermina

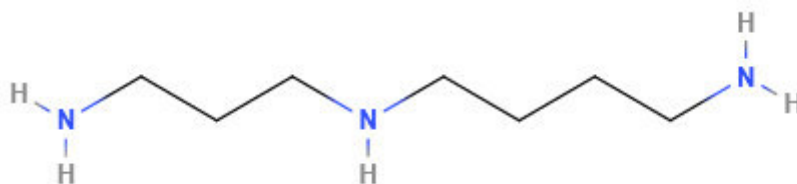


Figura 44. Estructura química de la espermidina

En las figuras 45,46, 47 se puede observar las diferentes microespecies de la espermina presentes en un rango de pH de 7.0 a 7.4, además a cada microespecie se le asignó un símbolo para su mejor identificación.

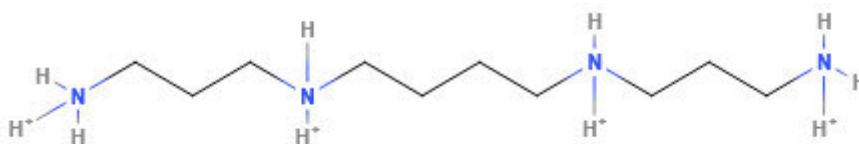


Figura 45. Microespecie S-1

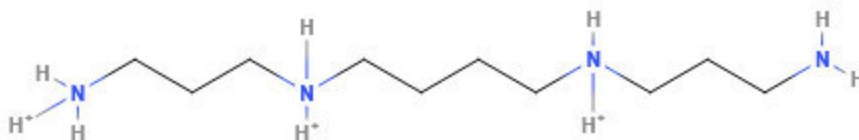


Figura 46. Microespecie S-2

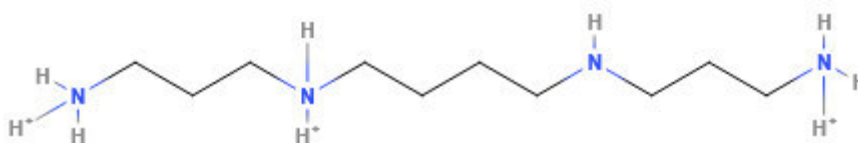


Figura 47. Microespecie S-3

En las figuras 48, 49, 50 se puede observar las diferentes microespecies de la espermidina presentes en un rango de pH de 7.0 a 7.4, además a cada microespecie se le asignó un símbolo para su mejor identificación.

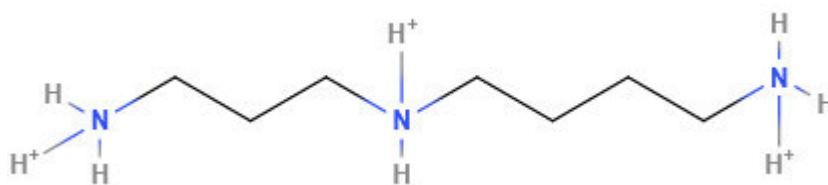


Figura 48. Microespecie SD-1

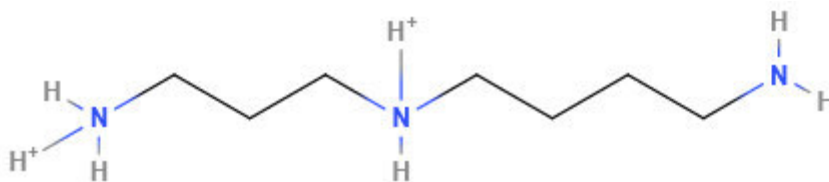


Figura 49. Microespecie SD-2

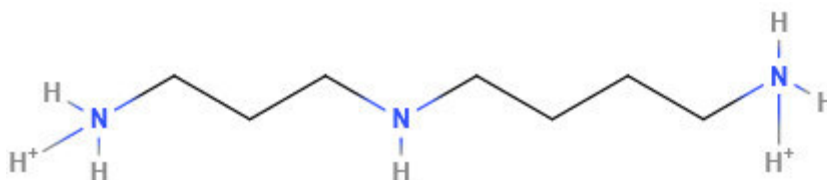


Figura 50. Microespecie SD-3

En la tabla 17 puede apreciarse la abundancia (en porcentaje) de cada microespecie de espermidina y espermina en un determinado valor de pH.

Tabla 17. Abundancia en porcentajes de cada Microespecie a diferente pH

	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.4
Microespecie S-1	87.20%	80.82%	72.05 %
Microespecie S-2	9.42%	13.83 %	19.54 %
Microespecie S-3	2.94%	4.32 %	6.10 %
Microespecie SD-1	93.32 %	89.81 %	84.75 %
Microespecie SD-2	5.04 %	7.69 %	11.49 %
Microespecie SD-3	1.57 %	2.40 %	3.59 %

En la tabla 17 se puede observar que a un pH similar al que existe en el citoplasma celular la mayoría de esperminas y espermidinas presentan todos sus grupos aminos cargados positivamente. Sin embargo, se observa que, a este pH también existen en menor cantidad, poliaminas con un grupo amino sin carga.

4.1.7 Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con poliaminas

4.1.7.1 Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina

En la tabla 18 se puede observar los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina; asimismo, en la tabla 19 puede observarse el pKa de los grupos químicos ionizables. Se aprecia que estos aductos presentan un TPSA menor a 120 \AA^2 ; por tanto, podrían atravesar membranas biológicas. Asimismo, poseen grupos químicos que pueden donar o aceptar átomos de hidrógeno. Además, de acuerdo con su punto isoeléctrico, estos aductos presentan grupos cargados a pH 7. Sin embargo, la formación de estos aductos no sería un proceso espontáneo, pues tienen un $\Delta_r G^\circ$ positivo.

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina

	Epóxido de eugenol-espermina	Quinona metilada-espermina (estructura 1)	Quinona metilada-espermina (estructura 2)
FSP3	0.70	0.60	0.60
TPSA	111.80 \AA^2	91.57 \AA^2	91.57 \AA^2
Refractividad molar	$111.11 \text{ cm}^3/\text{mol}$	$110.71 \text{ cm}^3/\text{mol}$	$109.22 \text{ cm}^3/\text{mol}$
Donantes de hidrógeno	6	5	5
Aceptores de hidrógeno	7	6	6
Punto isoeléctrico	10.67	10.62	10.60
Log P	-1.08	-0.23	-0.80
Volumen de Van der Waals	395.07 \AA^3	379.59 \AA^3	379.45 \AA^3
Área superficial de Van der Waals	681.06 \AA^2	641.27 \AA^2	639.44 \AA^2
$\Delta_r G^\circ$	156.04 KJ/mol	375.52 KJ/mol	380.70 KJ/mol

Tabla 19. pKa de los grupos ionizables

Grupo químico	Epóxido de eugenol-espermina	Quinona metilada-espermina (estructura 1)	Quinona metilada-espermina (estructura 2)
NH ₂ - 1	9.87	8.26	8.16
NH-2	10.87	10.31	10.28
NH-3	10.37	10.83	10.81
NH-4	8.32	7.52	6.82
O-2	7.68	9.77	9.72
O-3	14.84	-----	-----

En las figuras 51, 52 y 53 se puede apreciar las estructuras químicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermina (estructura 1) y quinona metilada-espermina (estructura 2), respectivamente.

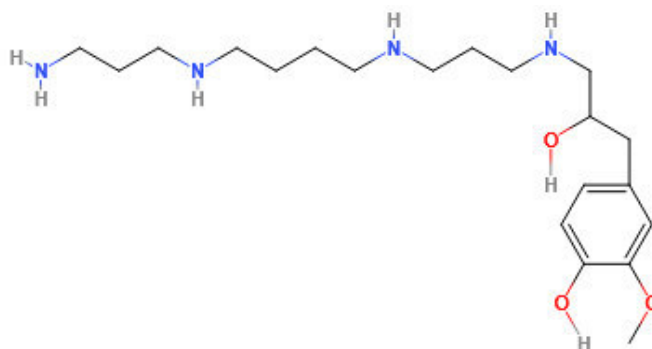


Figura 51. Aducto epóxido de eugenol-espermina

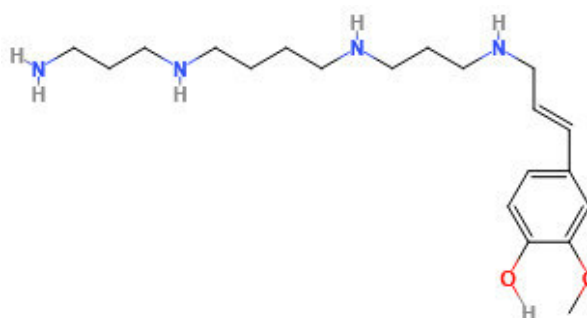


Figura 52. Aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

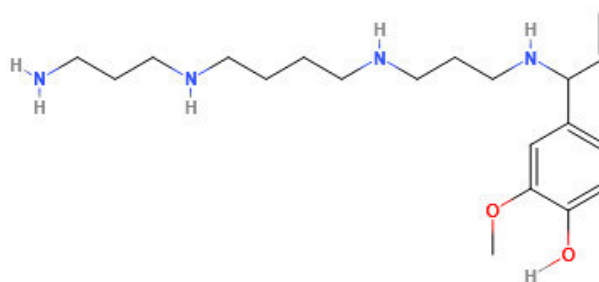


Figura 53. Aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

En las figuras 54, 55 y 56 se puede apreciar las estructuras químicas en 3D de aductos de epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermina (estructura 1) y quinona metilada-espermina (estructura 2), respectivamente; asimismo, se le asignó un número a cada átomo de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

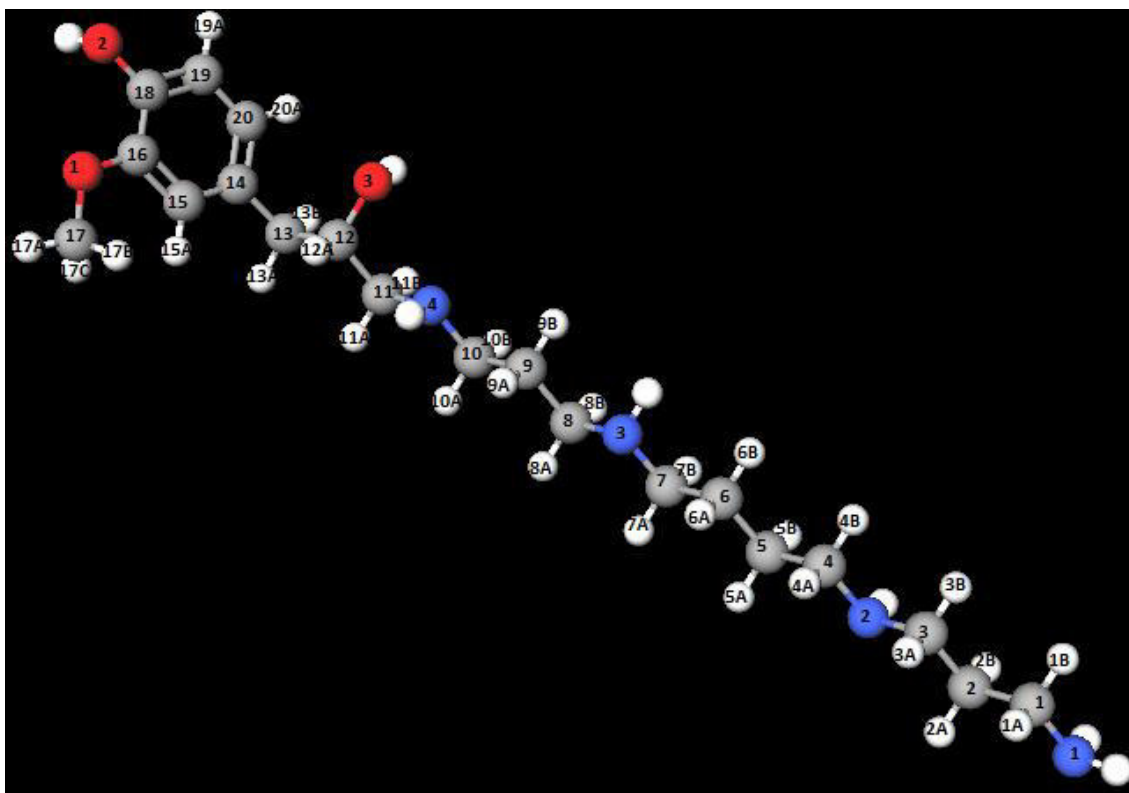


Figura 54. Estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-espermina

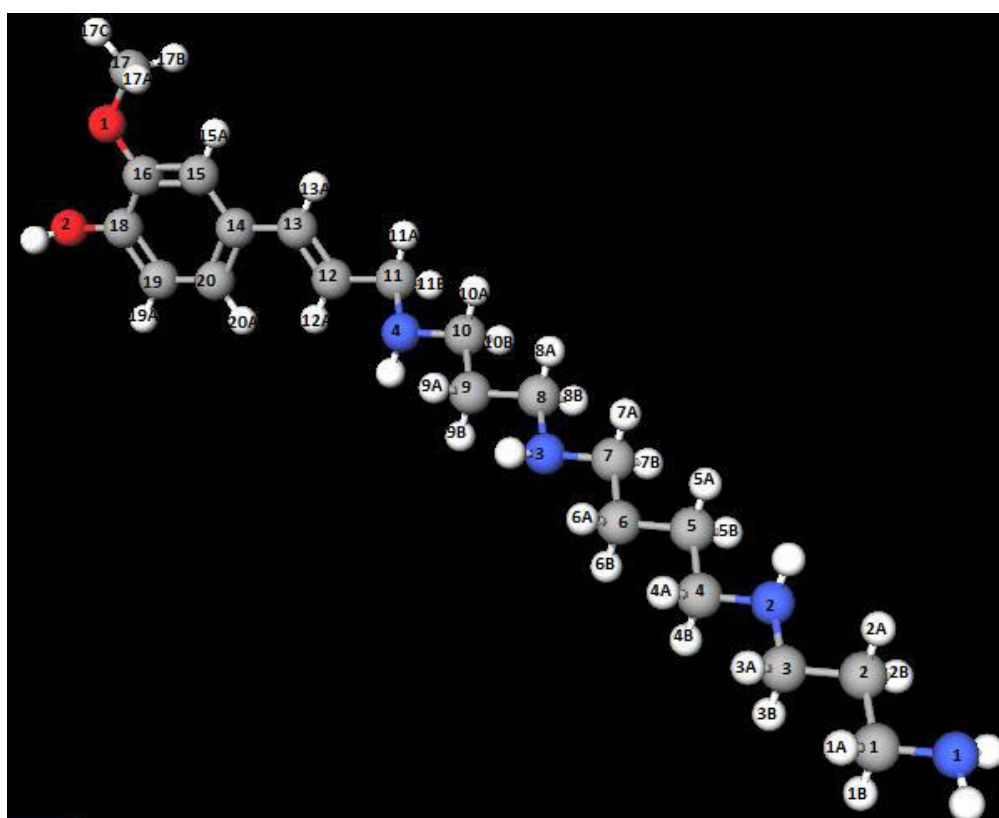


Figura 55. Estructura en 3D del aducto de quinona metilada-espermina (estructura 1)

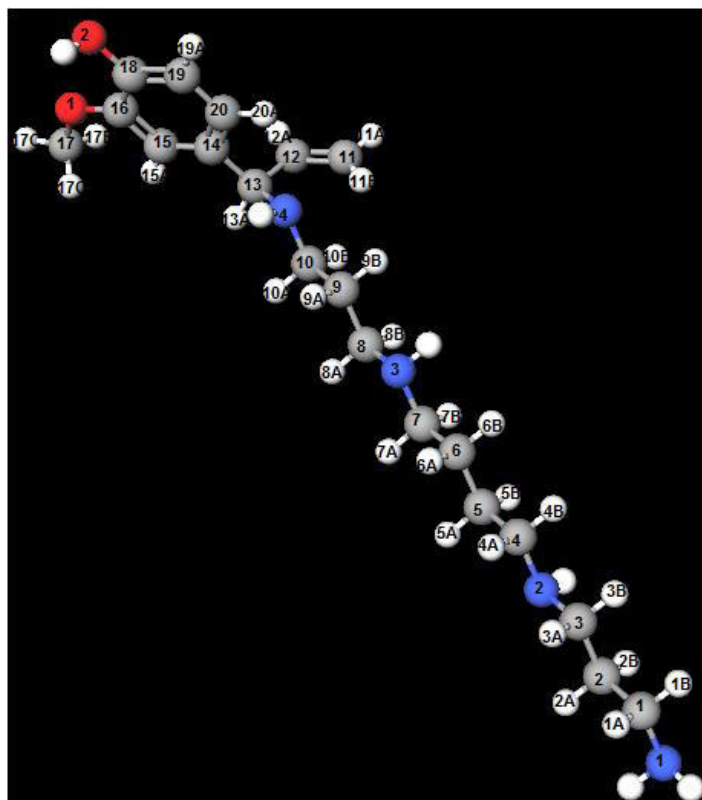


Figura 56. Estructura en 3D del aducto de quinona metilada-espermina (estructura 2)

En la tabla 20 puede observarse el desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina; además puede apreciarse los resultados obtenidos a partir de dos *softwares*.

Tabla 20. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Átomo de hidrógeno	Epóxido de eugenol-espermina ChemAxon (ppm)	Epóxido de eugenol-espermina predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-espermina (estructura 1) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-espermina (estructura 1) predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-espermina (estructura 2) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-espermina (estructura 2) predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)
1A	2.55	2.54	2.75	2.54	2.55	2.54
1B	2.95	2.60	2.75	2.60	2.95	2.60
2A	1.45	1.47	1.63	1.49	1.45	1.51
2B	1.81	1.47	1.63	1.47	1.81	1.47
3A	2.52	2.54	2.69	2.54	2.52	2.52
3B	2.86	2.54	2.69	2.54	2.86	2.51
4A	2.52	2.54	2.69	2.54	2.52	2.54
4B	2.86	2.54	2.69	2.54	2.86	2.54
5A	1.37	1.47	1.48	1.49	1.37	1.51
5B	1.59	1.58	1.48	1.58	1.59	1.58
6A	1.37	1.47	1.48	1.49	1.37	1.51
6B	1.59	1.57	1.48	1.57	1.59	1.57
7A	2.52	2.54	2.69	2.54	2.52	2.54
7B	2.86	2.54	2.69	2.54	2.86	2.54
8A	2.52	2.52	2.69	2.54	2.52	2.54
8B	2.86	2.54	2.69	2.54	2.86	2.54
9A	1.22	1.47	1.34	1.49	1.26	1.51
9B	1.59	1.49	1.34	1.49	1.62	1.51
10A	2.52	2.54	2.69	2.52	2.49	2.68
10B	2.86	2.54	2.69	2.54	2.82	2.68
11A	2.78	2.85	3.23	3.04	4.43	5.00
11B	2.87	2.85	3.23	3.04	5.18	5.03
12A	3.93	3.88	6.41	6.28	5.86	6.06
13A	2.44	2.54	6.46	6.49	4.75	6.69
13B	2.69	2.54	-----	-----	-----	-----
15A	6.12	6.57	7.14	7.10	6.83	6.69
17A	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
17B	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
17C	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
19A	6.78	6.63	6.80	6.68	6.82	6.64
20A	6.60	6.57	7.00	7.40	7.05	6.99

En la tabla 19 se observa que los hidrógenos unidos a los carbonos 15,19 y 20 presentan un mayor ^1H RMN, esto debido a que están unidos a carbonos hibridizados en sp^2 ; además formar parte de un anillo aromático. En los aductos de quinona metilada se observa algo similar, los hidrógenos unidos a los carbonos 12 y 13 presentan valores altos.

4.1.7.1 Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina

En la tabla 21 se puede observar los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina; asimismo, en la tabla 21 puede observarse el pKa de los grupos químicos ionizables.

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina

	Epóxido de eugenol-espermidina	Quinona metilada-espermidina (estructura 1)	Quinona metilada-espermidina (estructura 2)
FSP3	0.65	0.53	0.53
TPSA	99.77 Å ²	79.54 Å ²	79.54 Å ²
Refractividad molar	92.52 cm ³ /mol	93.12 cm ³ /mol	91.63 cm ³ /mol
Donantes de hidrógeno	5	4	4
Aceptores de hidrógeno	6	5	5
Punto isoeléctrico	10.61	10.56	10.54
Log P	-0.74	0.11	0.25
Volumen de Van der Waals	331.58 Å ³	315.46 Å ³	315.73 Å ³
Área superficial de Van der Waals	566.27 Å ²	529.37 Å ²	526.31 Å ²
Δ _f G°	41.39 KJ/mol	260.87 KJ/mol	266.05 KJ/mol

Tabla 22. pKa de los grupos ionizables

	Epóxido de eugenol-espermidina	Quinona metilada-espermidina (estructura 1)	Quinona metilada-espermidina (estructura 2)
1- NH ₂	10.27	10.20	10.17
2-NH	10.77	10.72	10.69
3-NH	7.87	6.64	6.84
2- OH	9.77	9.69	9.64
3-OH	14.84	----	-----

Se observa en la tabla 21 que estos aductos presentan un TPSA menor a 120 Å²; por tanto, podrían atravesar membranas biológicas. Asimismo, poseen grupos químicos que pueden donar o aceptar átomos de hidrógeno; por tanto, podrían formar puentes de hidrógeno. Además, de acuerdo con su punto isoeléctrico, estos aductos presentan grupos cargados a pH 7. Sin embargo, la formación de estos aductos no sería un proceso espontáneo, pues tienen un Δ_fG° positivo.

En las figuras 57, 58 y 59 se puede apreciar las estructuras químicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina, quinona metilada-espermidina (estructura 1) y quinona metilada-espermidina (estructura 2), respectivamente.

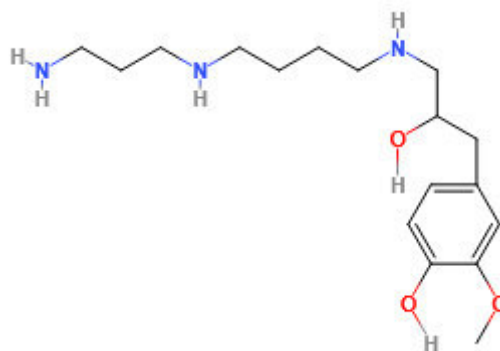


Figura 57. Aducto epóxido de eugenol-espermidina

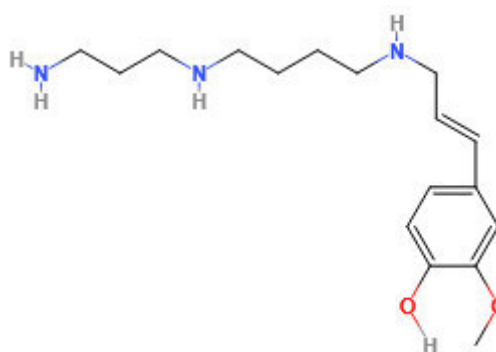


Figura 58. Aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

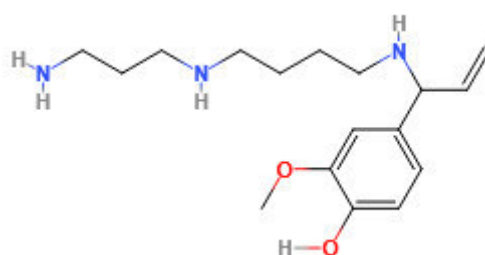


Figura 59. Aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

En las figuras 60, 61 y 62 se puede apreciar las estructuras químicas en 3D de aductos de epóxido de eugenol-espermidina, quinona metilada-espermidina (estructura 1) y quinona metilada-espermidina (estructura 2), respectivamente; asimismo, se le asignó un número a cada átomo de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

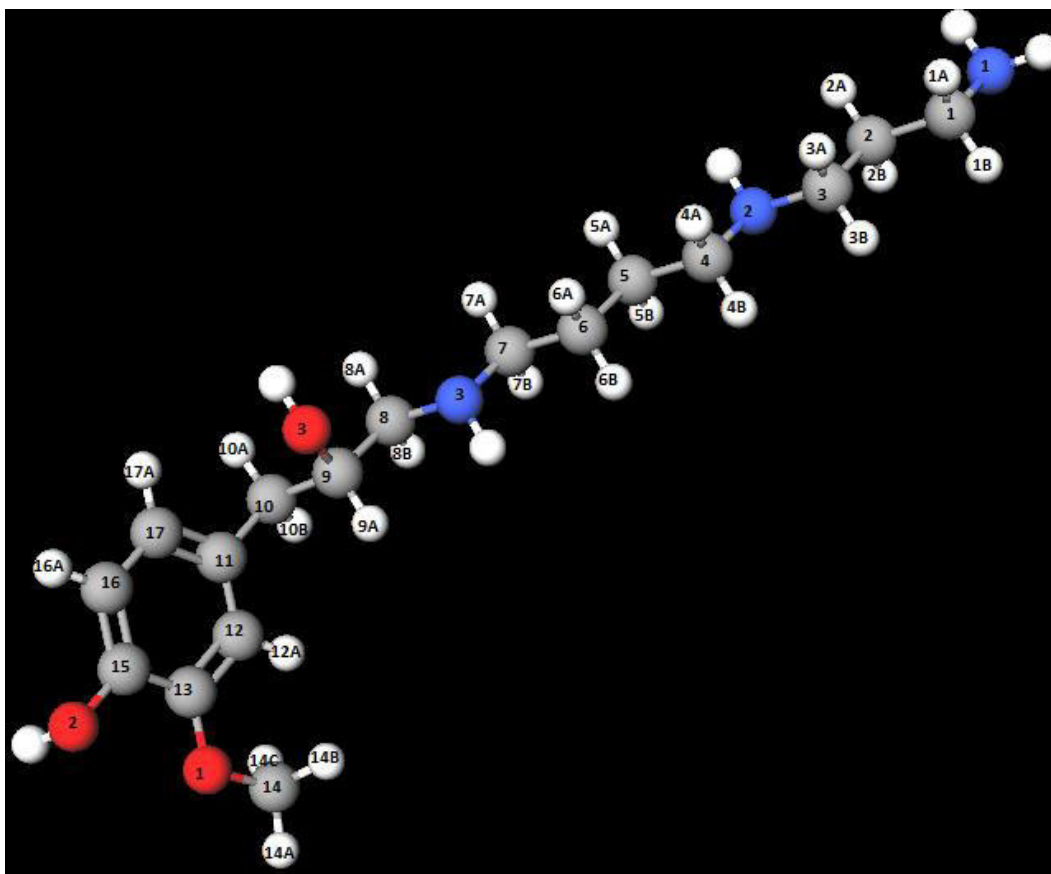


Figura 60. Estructura en 3D del aducto epóxido de eugenol-espermidina

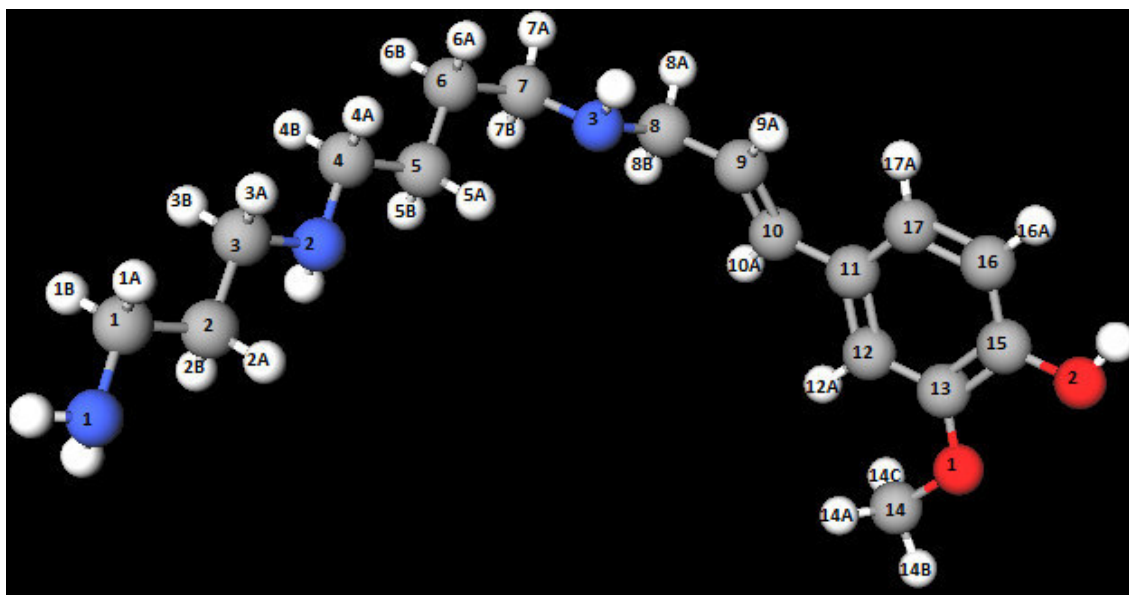


Figura 61. Estructura en 3D del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

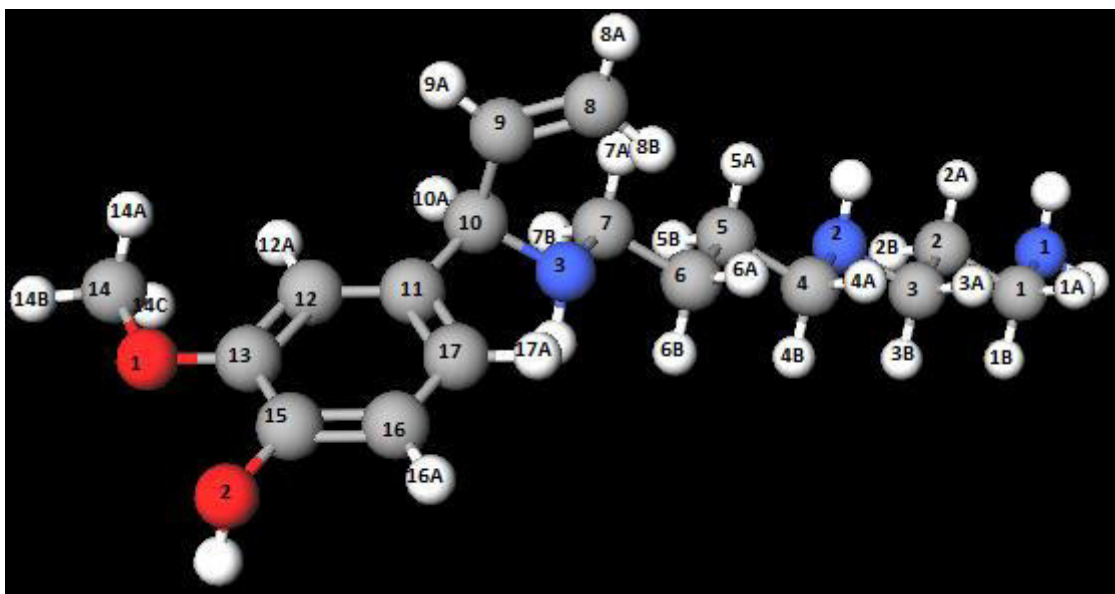


Figura 62. Estructura en 3D del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

En la tabla 23 puede observarse el desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina; además puede apreciarse los resultados obtenidos a partir de dos *softwares*. Se observa que los hidrógenos unidos a los carbonos 12, 15 y 16 presentan un mayor ^1H RMN, esto debido a que están unidos a carbonos hibridizados en sp^2 ; además formar parte de un anillo aromático. En los aductos de quinona metilada se observa algo similar, los hidrógenos unidos a los carbonos 9 y 10 presentan valores altos.

Tabla 23. Desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno

Átomo de hidrógeno	Epóxido de eugenol-espermidina predictor 1D 1H NMR ChemAxon (ppm)	Epóxido de eugenol-espermidina predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-espermidina (estructura 1) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-espermidina (estructura 1) predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)	Quinona metilada-espermidina (estructura 2) ChemAxon (ppm)	Quinona metilada-espermidina (estructura 2) predictor 1D 1H NMR spectra (ppm)
1A	2.61	2.62	2.81	2.62	2.61	2.62
1B	3.01	2.62	2.81	2.62	3.01	2.68
2A	1.25	1.51	1.35	1.51	1.26	1.51
2B	1.48	1.51	1.35	1.51	1.49	1.51
3A	1.37	1.51	1.48	1.51	1.37	1.51
3B	1.59	1.57	1.48	1.57	1.59	1.57
4A	2.52	2.53	2.69	2.53	2.52	2.53
4B	2.86	2.53	2.69	2.53	2.86	2.53
5A	2.52	2.52	2.69	2.52	2.52	2.52
5B	2.86	2.53	2.69	2.53	2.86	2.53
6A	1.24	1.49	1.36	1.49	1.28	1.51
6B	1.61	1.51	1.36	1.51	1.64	1.53
7A	2.52	2.53	2.69	2.52	2.49	2.68
7B	2.86	2.54	2.69	2.53	2.82	2.68
8A	2.79	2.85	3.23	3.04	5.18	5.00
8B	2.89	2.85	3.23	3.04	4.48	5.03
9A	3.95	3.88	6.41	6.28	5.83	6.06
10A	2.46	2.61	6.46	6.49	4.77	4.69
10B	2.71	2.62	-----	-----	-----	-----
12A	6.12	6.57	7.14	7.10	6.83	6.69
14A	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
14B	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
14C	3.87	3.78	3.87	3.79	3.87	3.79
15A	6.78	6.63	6.80	6.68	6.82	6.64
16A	6.60	6.57	7.00	7.40	7.05	6.99

4.1.8 Reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-poliaminas y quinona metilada-poliaminas

4.1.8.1 Metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina en microorganismos aeróbicos

En las figuras 63, 64, 65 y 66 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-espermina en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

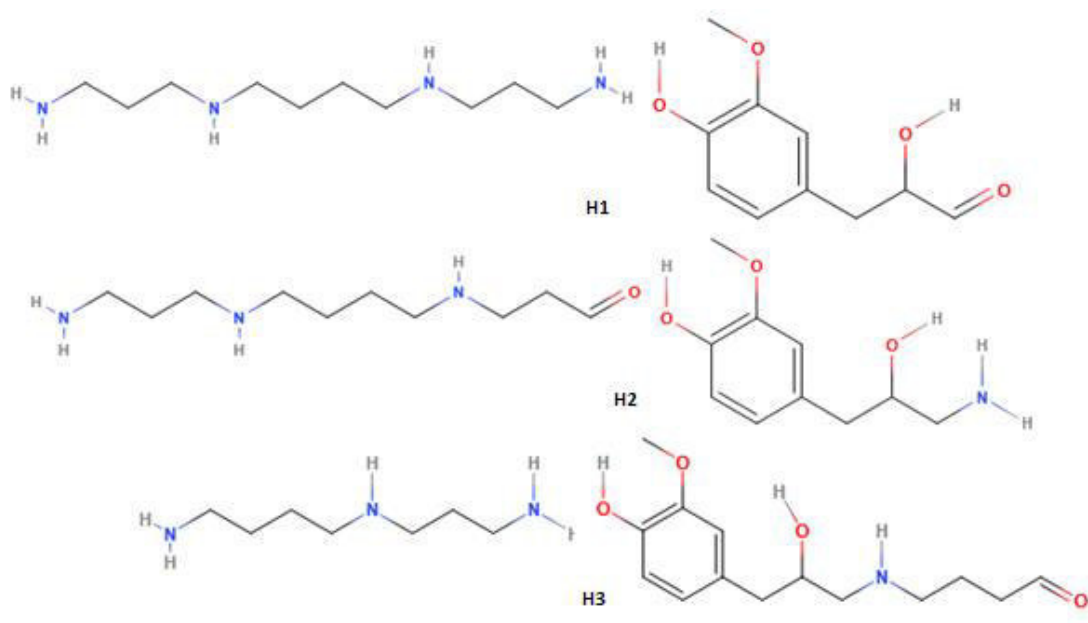


Figura 63. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

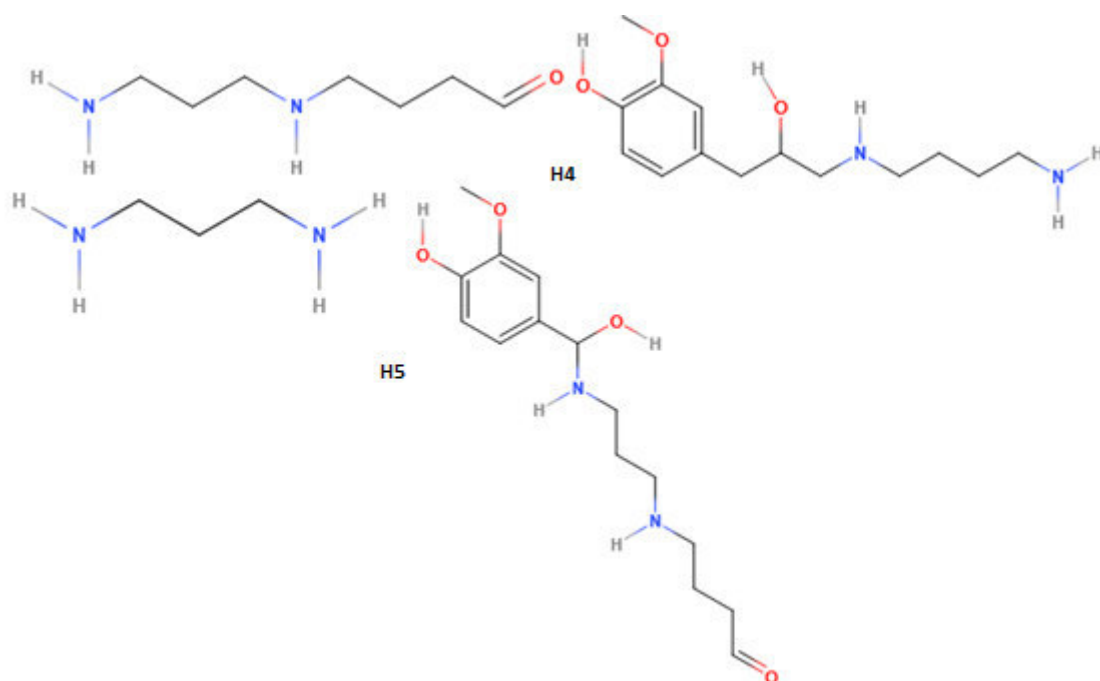


Figura 64. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

En las figuras 63, 64, 65 y 66 se observa que la desaminación oxidativa se puede dar en los carbonos 1,3,4,7,8,10 y 11; además, en estas reacciones se producen compuestos con grupos carbonilo. La O-desalquilación en el carbono 17 y la oxidación del grupo hidroxilo son también procesos probables.

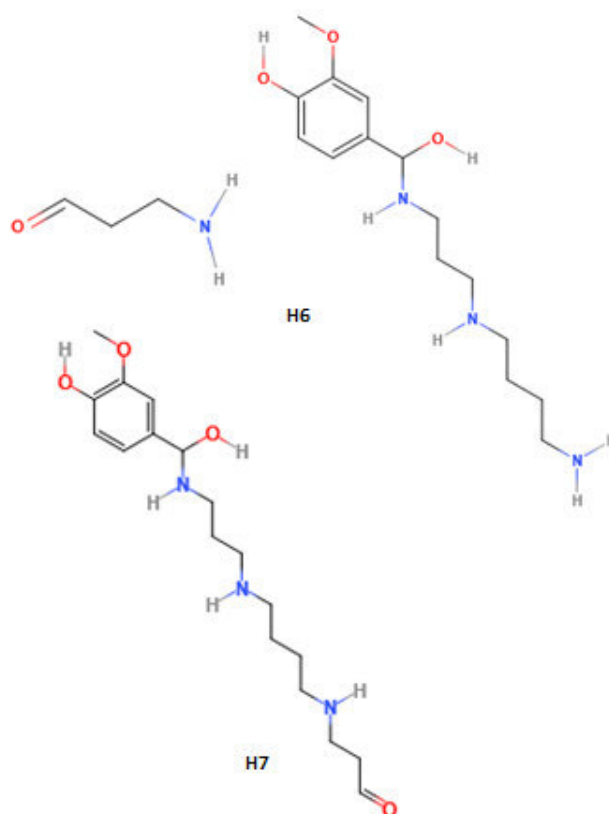


Figura 65. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

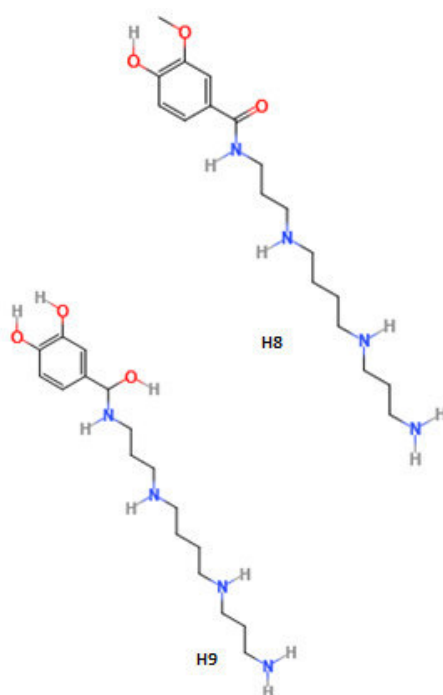


Figura 66. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermina

En las figuras 67, 68, 69 y 70 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de quinona metilada-espermina (estructura 1) en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

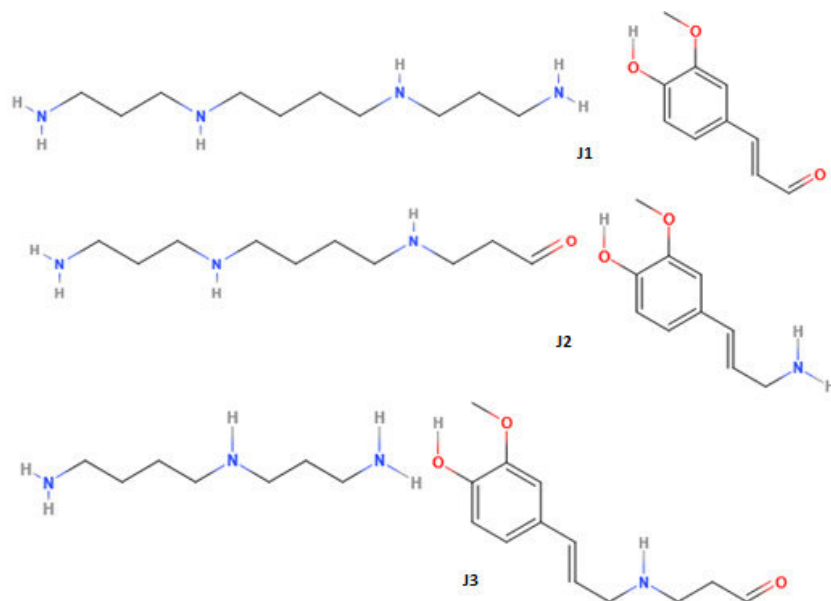


Figura 67. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

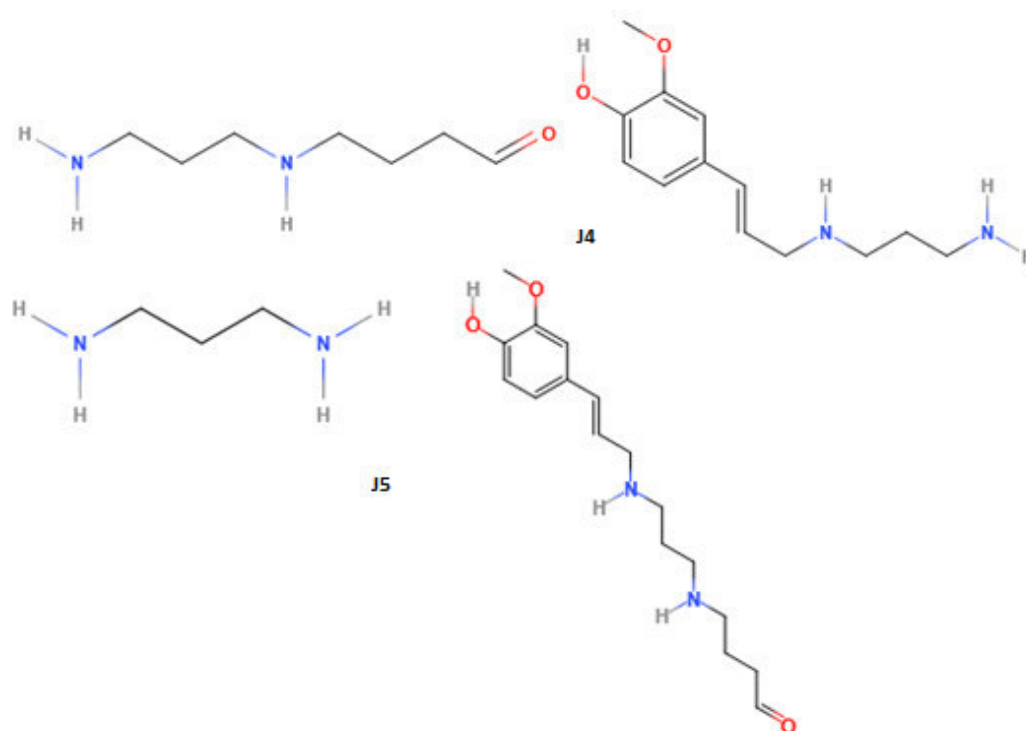


Figura 68. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

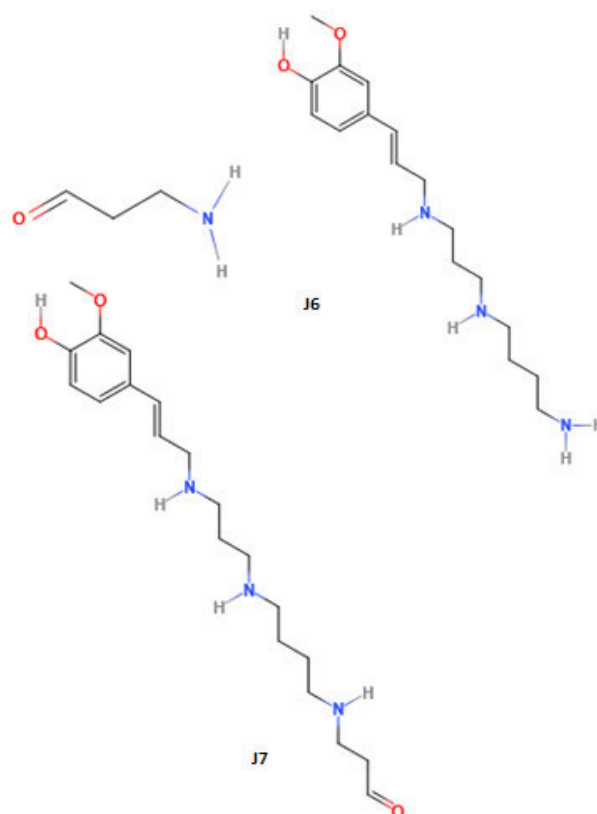


Figura 69. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

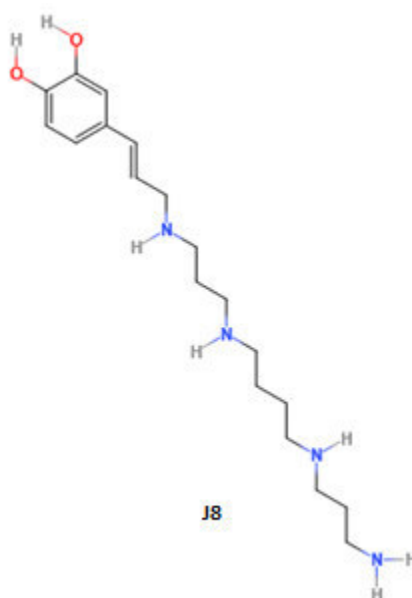


Figura 70. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 1)

En las figuras 71, 72 y 73 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de quinona metilada-espermina (estructura 2) en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

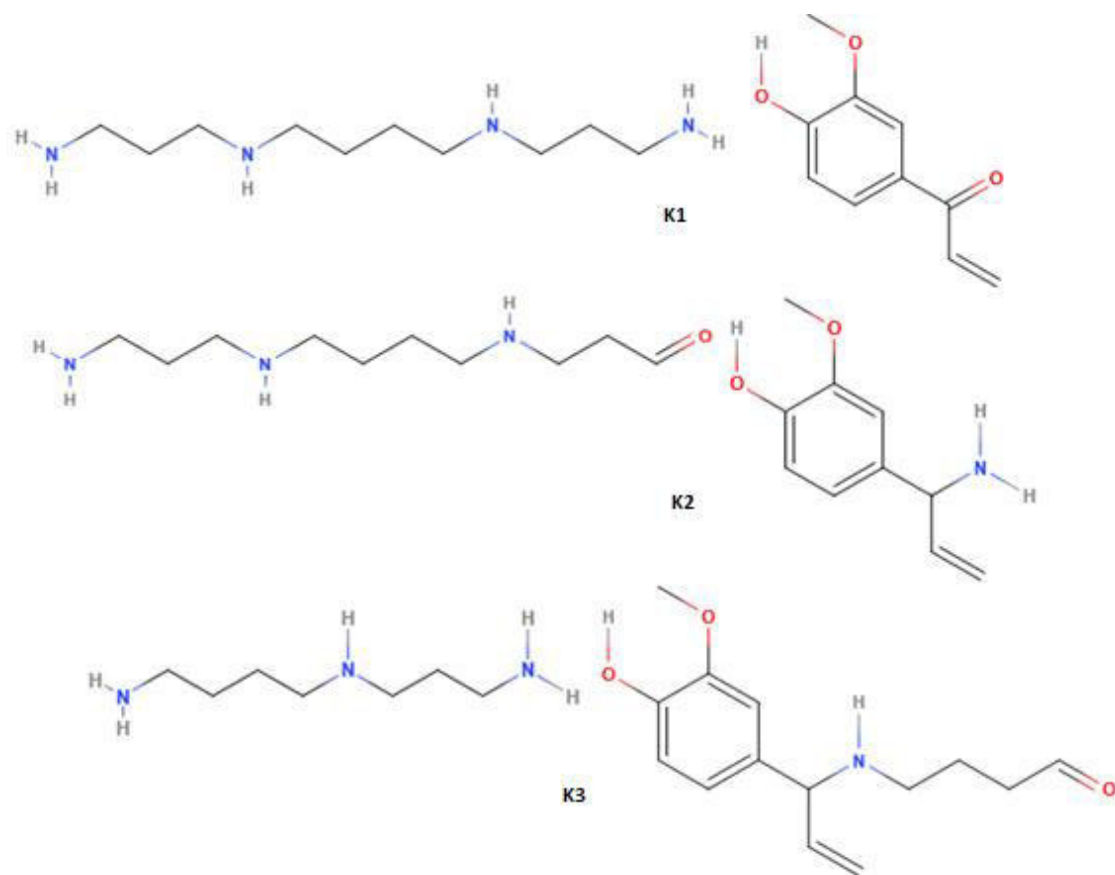


Figura 71. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

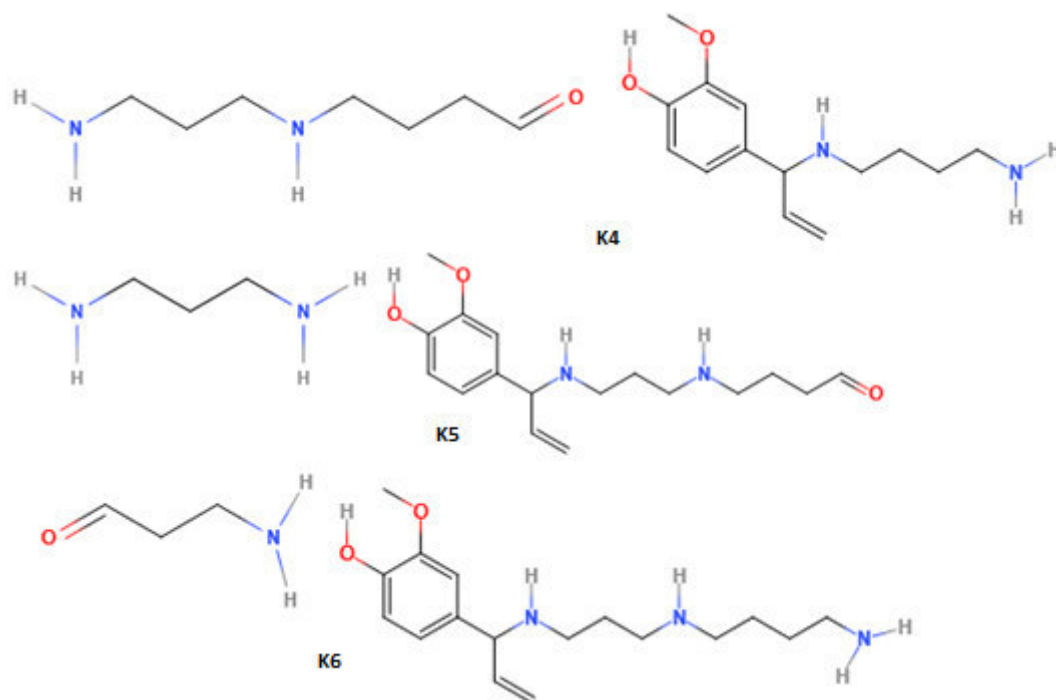


Figura 72. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

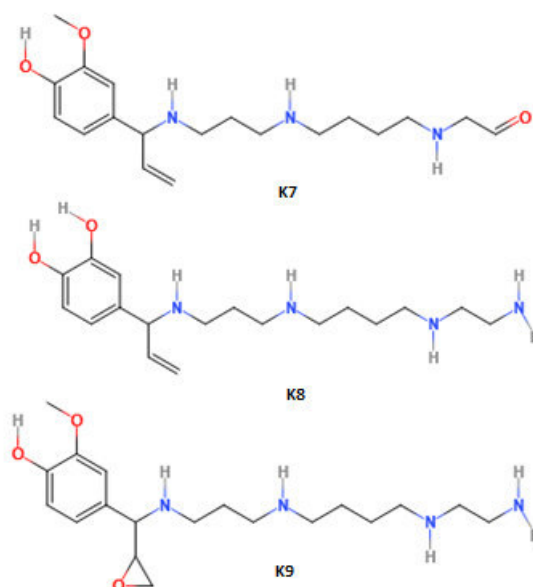


Figura 73. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2)

Se puede observar que los carbonos 1,3,4,7,8 y 10 de los aductos de quinona metilada-espermina son susceptibles a la desaminación oxidativa; asimismo, el carbono 17 a la O-desalquilación. Además, el grupo metino del aducto quinona metilada-espermina (estructura 2) es susceptible a la epoxidación.

En la tabla 24 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 24. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-espermina y quinona metilada-espermina

Epóxido de eugenol-espermina	Quinona metilada-espermina (estructura 1)	Quinona metilada-espermina (estructura 2)
Desanimación oxidativa en el carbono 11 (H1)	Desanimación oxidativa en el carbono 11 (J1)	Desanimación oxidativa en el carbono 13 (K1)
Desanimación oxidativa en el carbono 10 (H2)	Desanimación oxidativa en el carbono 10 (J2)	Desanimación oxidativa en el carbono 10 (K2)
Desanimación oxidativa en el carbono 8 (H3)	Desanimación oxidativa en el carbono 8 (J3)	Desanimación oxidativa en el carbono 8 (K3)
Desanimación oxidativa en el carbono 7 (H4)	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (J4)	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (K4)
Desanimación oxidativa en el carbono 4 (H5)	Desanimación oxidativa en el carbono 4 (J5)	Desanimación oxidativa en el carbono 4 (K5)
Desanimación oxidativa en el carbono 3 (H6)	Desanimación oxidativa en el carbono 3 (J6)	Desanimación oxidativa en el carbono 3 (K6)
Desanimación oxidativa en el carbono 1 (H7)	Desanimación oxidativa en el carbono 1 (J7)	Desanimación oxidativa en el carbono 1 (K7)
Oxidación del hidroxilo en el oxígeno 3 (H8)	O-desalquilación en el carbono 17 (J8)	O-desalquilación en el carbono 17 (K8)
O-desalquilación en el carbono 17 (H9)		Epoxidación del grupo metino (K9)

4.1.8.2 Metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina en microorganismos aeróbicos

En las figuras 74 y 75 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-espermidina en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

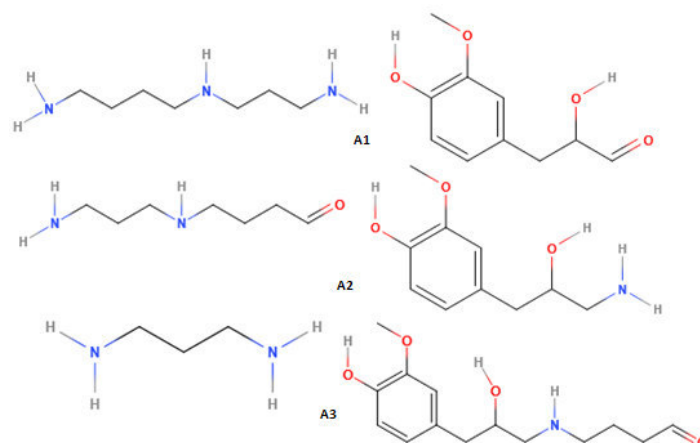


Figura 74. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermidina

En las figuras 74 y 75 se observa que la desaminación oxidativa se puede dar en los carbonos 1,3,4,7 y 8; además, en estas reacciones se producen compuestos con grupos carbonilo. La O-desalquilación en el carbono 14 y la oxidación del grupo hidroxilo son también procesos probables.

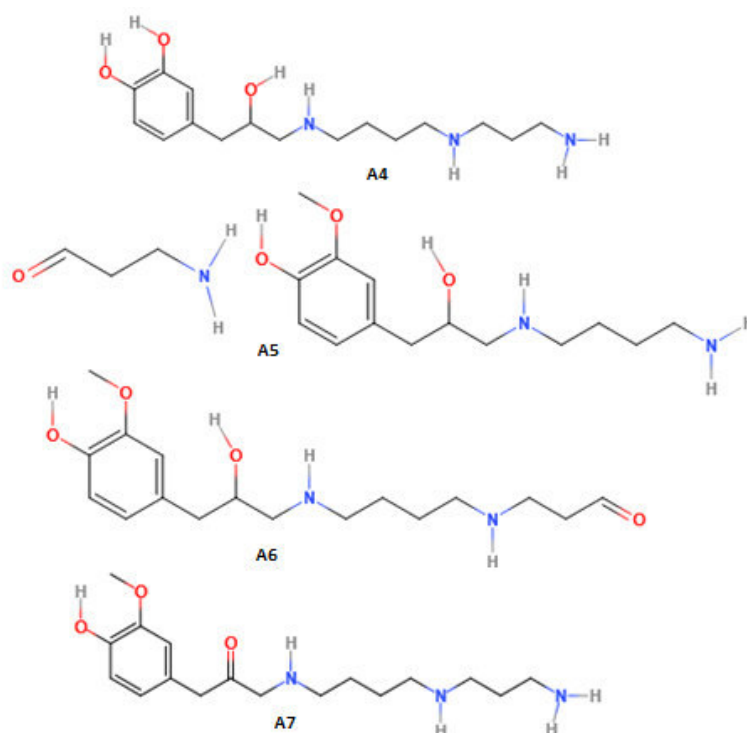


Figura 75. Productos del metabolismo del aducto epóxido de eugenol-espermidina

En las figuras 76, 77 y 78 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de quinona metilada-espermidina (estructura 1) en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

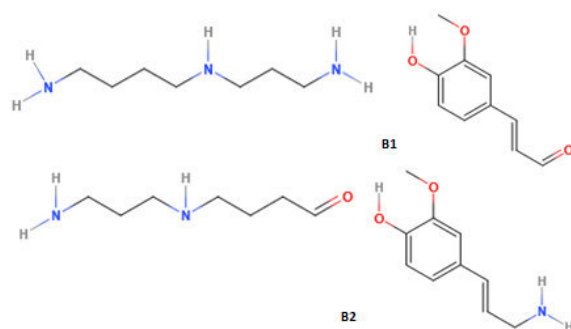


Figura 76. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

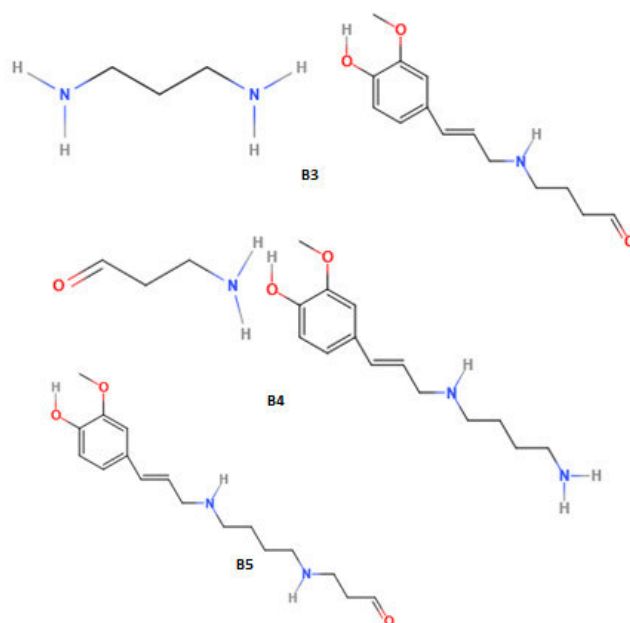


Figura 77. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

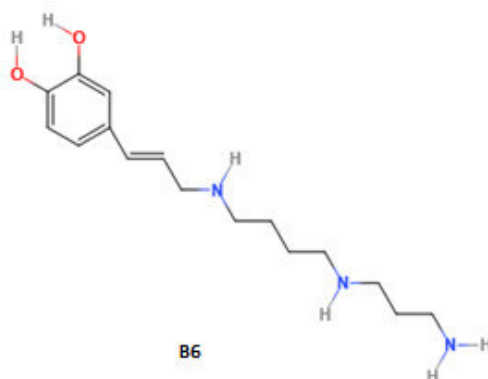


Figura 78. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 1)

Se puede observar que los carbonos 1,3,4 y 7 de los aductos de quinona metilada-espermidina son susceptibles a la desaminación oxidativa; asimismo, el carbono 14 a la O-desalquilación. Además, el grupo metino del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2) es susceptible a la epoxidación.

En las figuras 79 y 80 se pueden apreciar los productos del metabolismo de aductos de quinona metilada-espermidina (estructura 2) en microorganismos aeróbicos, predicha por el *software* EAWAG-BBD.

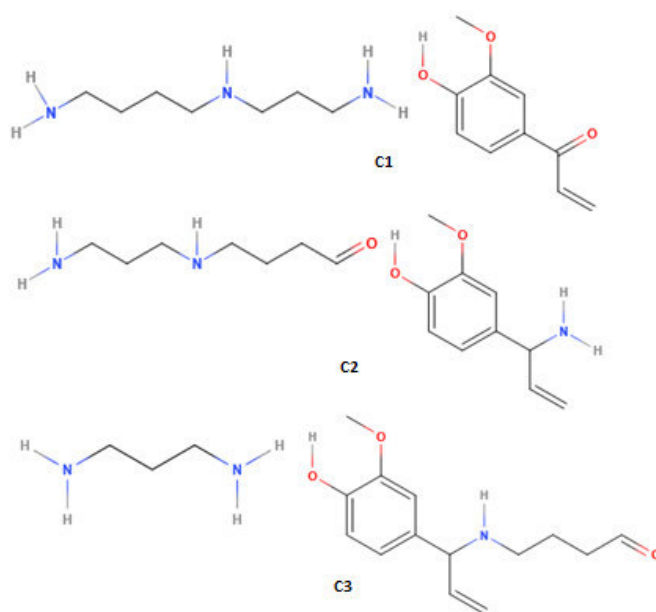


Figura 79. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

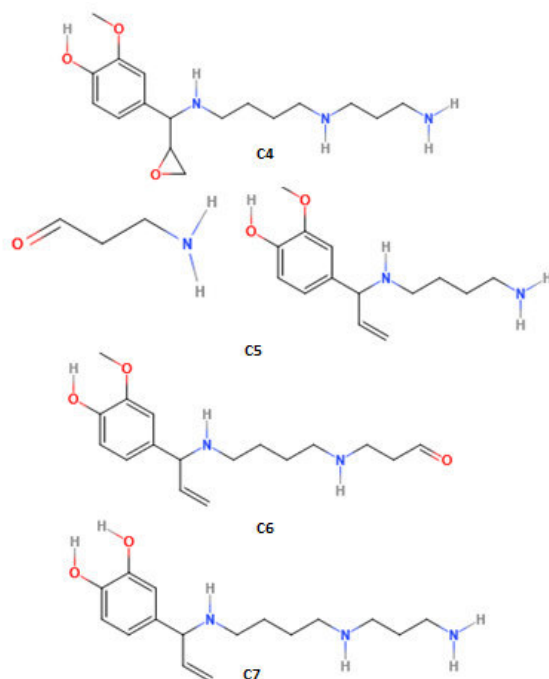


Figura 80. Productos del metabolismo del aducto quinona metilada-espermidina (estructura 2)

En la tabla 25 se detallan los mecanismos por los cuales se obtienen los productos metabólicos de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina; asimismo, en dicha tabla puede apreciarse, entre paréntesis, el tipo de compuesto generado en determinada reacción.

Tabla 25. Reacciones metabólicas de aductos de epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina

Epóxido de eugenol-espermidina	Quinona metilada-espermidina (estructura 1)	Quinona metilada-espermidina (estructura 2)
Desanimación oxidativa en el carbono 8 (A1)	Desanimación oxidativa en el carbono 8 (B1)	Desanimación oxidativa en el carbono 10 (C1)
Desanimación oxidativa en el carbono 7 (A2)	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (B2)	Desanimación oxidativa en el carbono 7 (C2)
Desanimación oxidativa en el carbono 4 (A3)	Desanimación oxidativa en el carbono 4 (B3)	Desanimación oxidativa en el carbono 4 (C3)
Desanimación oxidativa en el carbono 3 (A4)	Desanimación oxidativa en el carbono 3 (B4)	Desanimación oxidativa en el carbono 3 (C4)
Desanimación oxidativa en el carbono 1 (A5)	Desanimación oxidativa en el carbono 1 (B5)	Desanimación oxidativa en el carbono 1 (C5)
Oxidación del grupo hidroxilo en el oxígeno 3 (A6)	O-desalquilación en el carbono 14 (B6)	O-desalquilación en el carbono 14 (C6)
O-desalquilación en el carbono 14 (A7)		Epoxidación del grupo metino (C7)

4.1.9 Análisis estadístico de los resultados

En las tablas 26, 27 y 28 se puede observar el coeficiente de correlación de Spearman entre la energía de activación (variable independiente) y SASA (variable dependiente), desplazamiento químico (variable independiente) y energía de activación (variable dependiente) y el desplazamiento químico (variable independiente) y SASA (variable dependiente).

Tabla 26. Coeficiente de correlación de Spearman del eugenol

	Energía de activación del eugenol	Desplazamiento químico del eugenol (ChemAxon)	Desplazamiento químico del eugenol (1D 1H NMR spectra)
SASA del eugenol	-0.51	-0.61	-0.43
Energía de activación del eugenol	---	0.87	0.98

Tabla 27. Coeficiente de correlación de Spearman del epóxido de eugenol

	Energía de activación del epóxido de eugenol	Desplazamiento químico del epóxido de eugenol (ChemAxon)	Desplazamiento químico del epóxido de eugenol (1D 1H NMR spectra)
SASA del epóxido de eugenol	-0.40	-0.21	-0.09
Energía de activación del epóxido de eugenol	----	0.24	0.03

Tabla 28. Coeficiente de correlación de Spearman de quinona metilada

	Energía de activación de quinona metilada	Desplazamiento químico de quinona metilada (ChemAxon)	Desplazamiento químico de quinona metilada (1D 1H NMR spectra)
SASA de quinona metilada	-0.76	-0.36	-0.82
Energía de activación de quinona metilada	-----	0.76	0.76

En las tablas 26,27 y 28 se puede observar que existe una correlación lineal negativa entre la energía de activación y el área de superficie accesible por solvente (SASA). Además, una correlación lineal positiva entre los resultados del ^1H NMR y la energía de activación y una correlación lineal negativa entre los resultados del ^1H NMR y el SASA.

4.2 DISCUSIÓN

Este estudio encontró que el eugenol, quinona metilada y epóxido de eugenol tienen un TPSA menor a 120 \AA^2 (tabla 1). Asimismo, tienen menos de 5 donantes de hidrógeno, tienen una masa molar menor a 500 Daltons, Log P menor a 5, tienen menos de 10 átomos de nitrógeno y oxígeno, tienen más de 10 enlaces rotativos; por lo tanto, el eugenol y derivados tienen buena bioabsorción y la capacidad para atravesar membranas biológicas. Un estudio previo encontró resultados similares, utilizando otro *software*⁷⁸. Se ha descrito que la capacidad antifúngica de un compuesto fenólico, como el eugenol, depende de su capacidad para alterar la fluidez de la membrana plasmática fúngica³². Por lo que, se ha propuesto que el Log P podría utilizarse para predecir dicha actividad³². Este estudio encontró que el epóxido de eugenol y quinona metilada poseen similar hidrofobicidad, pero menor Log P que el eugenol. Por lo que ambos interactuarían con membranas celulares, de manera similar.

Con respecto al análisis de la reactividad del eugenol y derivados, este estudio encontró que los átomos de carbono 4, 6 y 8 son los menos reactivos. Asimismo, la mayoría de las reacciones catalizadas por el citocromo P450 ocurren en los carbonos 1,2,3 y 7 en el eugenol y epóxido de eugenol y en los carbonos 1 y 7 en quinona metilada. Se encontró resultados cuando se evaluó la reactividad de estos compuestos en microorganismos aeróbicos. Un estudio previo encontró que el eugenol puede sufrir hidroxilación en el carbono 3, desalquilación en el carbono 1 y epoxidación en los carbonos 1,2; estas reacciones serían catalizadas por el citocromo P450⁷⁸.

Cuando se evaluó la reactividad en microorganismos aeróbicos, se encontró que el epóxido de eugenol y eugenol pueden sufrir una o-desalquilación en el carbono 7 y una hidroxilación en el carbono 2, además el eugenol puede sufrir una epoxidación en su grupo metino y formar epóxido de eugenol. Asimismo, el epóxido de eugenol es proclive a la apertura de su anillo epóxido. Con respecto a quinona metilada, el grupo alqueno de esta molécula puede sufrir una epoxidación. Por lo tanto, estos resultados indican que el eugenol y quinona metilada son propensos a la epoxidación. Esto se basa en el hecho de que los grupos alqueno son susceptibles a la epoxidación^{49,50}.

Los resultados del estudio (tabla 12) indican que los aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión poseen baja capacidad para atravesar membranas biológicas (TPSA mayor de 120 \AA^2), los resultados del Log P indican que poseen baja hidrofobicidad, por lo que no podrían formar interacciones hidrofóbicas con lípidos. Asimismo, estos aductos presentan un valor negativo de $\Delta_f G^\circ$; por lo cual las reacciones químicas que los originan serían termodinámicamente favorables. Además, a pH citoplasmático se presentan como moléculas cargadas, tienen donantes y aceptores de hidrógeno; por lo que, podrían formar puentes de hidrógeno. Se ha sugerido que las bajas concentraciones de glutatión reducido podrían deberse a la formación de aductos con quinona metilada y epóxido de eugenol^{20,21}.

En el análisis del metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-glutatión y quinona metilada-glutatión, utilizando el *software* EAWAG-BBD, se encontró que son susceptibles a una desanimación oxidativa en los átomos de carbono 2 y 7, además pueden sufrir una desmetilación con la consiguiente formación de un grupo hidroxilo. De la misma manera, todos los aductos son propensos a una N- desalquilación oxidativa en el

carbono 5, a una oxidación del azufre a sulfóxido y a una S-desalquilación oxidativa en los carbonos 10 y 11. Además el grupo alqueno del aducto de quinona metilada –glutación (estructura 2) es propenso a un epoxidación y el grupo hidroxilo en el oxígeno 7 del aducto epóxido de eugenol-glutación es proclive a una oxidación. Las reacciones presentadas son similares a las que se esperaría encontrar en compuestos fenólicos con grupos amino, carbonilo y tiol⁶⁸.

Cuando se estudió los de aductos de epóxido de eugenol-aminoácidos y quinona metilada-aminoácidos, se encontró que todos los aductos de epóxido de eugenol-aminoácidos tienen valores negativos de $\Delta_f G^\circ$, siendo las reacciones que originan los aductos de cisteína más termodinámicamente favorables. Estos resultados pueden explicarse debido a la alta reactividad del grupo epóxido⁵⁰. Por otro lado, solo aductos de quinona metilada-cisteína y quinona metilada-lisina presentaron valores de negativos de $\Delta_f G^\circ$. Por lo tanto, la formación de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con aminoácidos sería un proceso termodinámicamente favorable.

Se encontró que las poliaminas (espermidina y espermina) pueden atravesar membranas biológicas, formar puentes de hidrógeno y se presentan como moléculas cargadas a pH citoplasmático. Asimismo, se determinó la estructura química y abundancia de cada microespecie a diferente pH; siendo las microespecies S2 y SD2 candidatas para la formación de aductos con epóxido de eugenol y quinona metilada, ya que posee grupos amino sin carga. Anteriormente, diversos estudios han descrito la capacidad de estas moléculas de poseer grupos aminos cargados a pH fisiológico^{24,37,47}.

Los aductos de quinona metilada-espermina, epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina tienen bajo peso molecular, capacidad para formar puentes de hidrógeno y valores bajos de TPSA y refractividad molar. Por otro lado, el aducto de epóxido de eugenol-espermina tiene valores más altos de TPSA y refractividad molar. Además, todos estos aductos poseen valores positivos de $\Delta_f G^\circ$, estos valores se pueden explicar por la elevada cantidad de átomos de nitrógeno, ya que en el método de Joback un número alto de átomos de nitrógeno promueve un valor positivo en la $\Delta_f G^\circ$ ⁷⁶.

En el análisis del metabolismo de aductos de epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermina, epóxido de eugenol-espermidina y quinona metilada-espermidina, utilizando el *software* EAWAG-BBD, se observó que son susceptibles a una desaminación oxidativa en distintos carbonos, también son proclives a una o-desalquilación. Asimismo, los grupos metino de los aducto quinona metilada-espermina (estructura 2) y quinona metilada-espermidina (estructura 2) son susceptibles a la epoxidación. Estas reacciones son similares a las descritas en moléculas con abundantes grupos aminos cuando son metabolizadas por el citocromo P450⁶⁸.

En el análisis del ¹H NMR se encontró valores más altos en átomos de hidrógeno unidos a grupos carbonilo o enlaces doble carbono-carbono, también se encontró valores altos en átomos de hidrogeno cercanos a grupos amino o cercanos a átomos de oxigeno o azufre. Estos resultados se deben a que los valores del desplazamiento químico dependen de la densidad electrónica cercana a los núcleos atómicos del hidrogeno⁷⁹.

Por último, se encontró una correlación lineal negativa entre los valores de la energía de activación y el área de superficie accesible por solvente (SASA). Asimismo, se halló una

correlación lineal positiva entre los resultados del ^1H NMR y la energía de activación y, de la misma forma, se encontró una correlación lineal negativa entre los resultados del ^1H NMR y el SASA. Estos resultados indican que podría existir una relación entre la manera en como los aminoácidos y el grupo prostético del centro activo del citocromo P450 interactúan con los átomos de carbono del eugenol y derivados. Esta interacción sería similar a la forma en como los núcleos atómicos del hidrógeno interactúan con un campo magnético externo (como el RMN).

CONCLUSIONES

- Las reacciones que generan epóxido de eugenol y quinona metilada son termodinámicamente favorables. Asimismo, estas moléculas poseen similar hidrofobicidad e interactúan de manera similar con membranas biológicas. El epóxido de eugenol es un probable producto del metabolismo del eugenol, ya que el grupo metino del eugenol es susceptible a la epoxidación.
- La formación de los aductos de epóxido de eugenol-glutación y quinona metilada-glutación son procesos termodinámicamente favorables. Además, los aductos de epóxido de eugenol-glutación y quinona metilada-glutación son susceptibles a la desaminación oxidativa y desalquilación oxidativa en microorganismos aeróbicos.
- La formación de los aductos de epóxido de eugenol con lisina, arginina y cisteína son procesos termodinámicamente favorables.
- Las poliaminas (espermina y espermidina) a pH 7 presentan grupos cargados positivamente, asimismo, pueden atravesar membranas biológicas y formar puentes de hidrógeno.
- La formación de los aductos de epóxido de eugenol-espermidina, epóxido de eugenol-espermina, quinona metilada-espermidina y quinona metilada-espermina son procesos termodinámicamente no favorables y no podrían generarse espontáneamente.

RECOMENDACIONES

- Corroborar experimentalmente los datos hallados en este estudio.
- Evaluar experimentalmente la capacidad de los derivados del eugenol de formar aductos con glutatión y aminoácidos.
- Evaluar experimentalmente la actividad antifúngica de quinona metilada.
- Dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en el estrés oxidativo inducido por eugenol en *Candida albicans*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014; 10: 95–105. doi: 10.2147/TCRM.S40160.
2. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2):119-128. doi: 10.4161/viru.22913.
3. Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya GV. Prevalence and characterization of opportunistic candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016; 20(2): 183–189. doi: 10.4103/0973-029X.185913.
4. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(5):561-570. doi: 10.1086/655683.
5. Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(6): 42-48. doi: 10.1111/1469-0691.12513.
6. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eu Rev Med Pharmacol Sci.* 2004; 8: 69-77.
7. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flor C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58(2):2-13. doi: 10.1111/myc.12330.
8. Charan-Raja MR, Srinivasan V, Selvaraj S, Mahapatra SK. Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. *Pharmaceutica Analytica Acta.* 2015; 6(5): 367-372.
9. Kong X, Liu X, Li J, Yang Y. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. *Curr Opin Complement Alternat Med.* 2014; 1(1):8-11.
10. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med.* 2014; 24:51-56. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063.
11. Carrasco H, Raimondi M, Svetaz L, Di Liberto M, Rodriguez MV, Espinoza L. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. *Molecules.* 2012; 17: 1002-1024. doi: 10.3390/molecules17011002.
12. Jianhua W & Hai W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA.* 2009; 24(3): 142-147. doi: 10.1016/S1000-1948(09)60030-7.
13. Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microb Pathog.* 2010; 48: 35-41. doi: 10.1016/j.micpath.2009.10.001.
14. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Induction oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res.* 2011; 11:114-122. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00697. x.

15. Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*. 2013; 3(1):54-69. doi: 10.1186/2191-0855-3-54.
16. Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(12): 5062-69. doi: 10.1128/AAC.01050-10.
17. Zore GB, Thakre AD, Jadhav SS, Karuppayil M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 2011; 18: 1181– 90. doi: 10.1016/j.phymed.2011.03.008.
18. Ajiboye TO, Mohammed AO, Bello SA, Yusuf II, Ibitoye OB, Muritala HF, et al. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. *Microb Pathog*. 2016; 95: 208-215. doi: 10.1016/j.micpath.2016.03.011.
19. Bolton JL. Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Curr Org Chem*. 2014; 18(1): 61–69. doi: 10.2174/138527281801140121123046.
20. Yao H, Peng Y, Zheng J. Identification of glutathione and related cysteine conjugates derived from reactive metabolites of methyleugenol in rats. *Chem Biol Interact*. 2016; 253: 143-52. doi: 10.1016/j.cbi.2016.05.006.
21. Luo G, Guenther TM. Investigation of the role of the 2,3-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology*. 2011; 160(1-3): 47–58. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00456-x.
22. Koh T, Murakami Y, Tanaka S, Machino M, Onuma H, Kaneko M, et al. Changes of Metabolic Profiles in an Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Induced by Eugenol. *In Vivo*. 2013; 27(2):233-243.
23. Doorn JA & Petersen DR. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem Biol Interact*. 2003; 144:93-100. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00178-3.
24. Valdés-Santiago L & Ruiz-Herrera J. Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front Chem*. 2014; 1(42): 1-10. doi: 10.3389/fchem.2013.00042.
25. Olea AF, Bravo A, Martínez R, et al. Antifungal Activity of Eugenol Derivatives against *Botrytis Cinerea*. *Molecules*. 2019;24(7):1239. doi: 10.3390/molecules24071239.
26. Wang C., Zhang J., Chen H., Fan Y., Shi Z. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Trop. Plant Pathol*. 2010; 35:137–143. doi: 10.1590/S1982-56762010000300001.

27. Thompson DC, Constantin-Teodosiu D, Moldéus P. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 1991; 77(2):137- 147. doi: 10.1016/0009-2797(91)90069-j.
28. Sipes IP & Mattia A. Safety evaluation of certain food additives [Internet]. 2006 [Recuperado el 05 de Julio del 2017]; Disponible en <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>.
29. Rabanal J. Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada en *Candida albicans* [Tesis de Licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal; 2018.
30. Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2006; 23(10): 751 – 761. doi: 10.1002/yea.1393.
31. Fujisawa S & Kadoma Y. Kinetic Evaluation of Polyamines as Radical Scavengers. *Anticancer Res.* 2005; 25(2A): 965-970.
32. Gallucci MN, Carezzano ME, Olivia MM, Demo MS, Pizzolitto RP, Zunino MP, et al. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole- resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol.* 2014; 116(4): 795-804. doi:10.1111/jam.12432.
33. De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina.* 2012; 26(1):43-55.
34. Huamán-Reyes AM, Béjar-Castillo BR, Sevilla-Andrade CR, Sáez- Flores GM, Tapia-Barcellandi M, Guevara-Granados JM, et al. Aislamiento de *Candida albicans* de hisopado nasal y faríngeo en alumnos de secundaria. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2014; 75(2):181-183.
35. Birben E, Sahiner MU, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1): 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
36. Burton G, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25(3): 287–299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
37. Molina-Navarro MM. Las glutaredoxinas monotiólicas como reguladoras redox de proteínas: estudios funcionales y evolutivos en *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Doctorado]. Lérida: Universidad de Lérida; 2005.
38. Brown AJP, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, et al. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol.* 2014; 217(1):144-155. doi: 10.1242/jeb.088930.
39. Da Silva-Dantas A, Day A, Ikeh M, Kos L, Achan B, Quinn L. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules.* 2015; 5(1):142-65. doi: 10.3390/biom5010142.

40. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004; 134(3):489-92. doi: 10.1093/jn/134.3.489.
41. Collinson EJ & Grant CM. Role of Yeast Glutaredoxins as Glutathione S-transferases. *J Biol Chem.* 2003; 278(25): 489-492. doi: 10.1074/jbc.M301387200.
42. Breitenbach M, Weber M, Rinnerthaler M, Karl T, Breitenbach-Koller L. Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Host, and Lignocellulose Degradation. *Biomolecules.* 2015; 5(2):318-342. doi: 10.3390/biom5020318.
43. Upadhyaya R, Kim H, Jung KW, Park G, Lam W, Lodge JK, Bahn YS. Sulphiredoxin plays peroxiredoxin dependent and independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. *Mol Microbiol.* 2013; 90(3): 630 - 648. doi: 10.1111/mmi.12388.
44. Thon M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, Brakhage AA. The Thioredoxin System of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans* Impact on Development and Oxidative Stress Response. *J Biol Chem.* 2007; 282(37): 2759- 69. doi: 10.1074/jbc.M704298200.
45. Yin C, Zheng L, Zhu J, Chen L, Ma, A. Enhancing stress tolerance by overexpression of a methionine sulfoxide reductase A (MsrA) gene in *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(7):3115-26. doi: 10.1007/s00253-014-6365-4.
46. Herrero E, Ros J, Tamarit J, Bellí G. Glutaredoxins in fungi. *Photosynth Res.* 2006; 89(2-3):127-140. doi: 10.1007/s11120-006-9079-3.
47. Kim YC, Sim JH, Kim YH, Kwon SC, Lee SJ, Kim SR. Effects of Polyamines on Contractility of Guinea-Pig Gastric Smooth Muscle. *J Korean Med Sci.* 2007; 22(1): 48–56. doi: 10.3346/jkms.2007.22.1.48.
48. Liu JH, Wang W, Wu H, Gong X, Moriguchi T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci.* 2015; 6(827): 1-10. doi: 10.3389/fpls.2015.00827.
49. Garcia-Sanchez A. Isomerización de los epóxidos lineales en fase líquida sobre catalizadores heterogéneos [Tesis de Doctorado]. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos; 2005.
50. Solomons TWG. Química Orgánica. 2a.ed. Mexico: Limusa; 2004.
51. Maresca M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins.* 2013; 5(4): 784-820. doi: 10.3390/toxins5040784.
52. Achilias DS, Karabela MM, Varkopoulou EA, Siderido ID. Cure Kinetics Study of Two Epoxy Systems with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). *Journal of Polymer Science. Part A-1, Polymer Chemistry.* 2013; 49:630- 638. doi: 10.1080/10601325.2012.696995.

53. Elgendy EM & Khayyat SA. Oxidation Reactions of Some Natural Volatile Aromatic Compounds: Anethole and Eugenol. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008; 44(6): 823–829.
54. Behbahani M. Evaluation of In Vitro Anticancer Activity of *Ocimum Basilicum*, *Alhagi Maurorum*, *Calendula Officinalis* and Their Parasite *Cuscuta Campestris*. *PloS One*. 2014; 9(12): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0116049.
55. Tu T, Giblin D, Gross ML. A Structural Determinant of Chemical Reactivity and Potential Health Effects of Quinones from Natural Products. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24(9):1527-39. doi: 10.1021/tx200140s.
56. Bolton JL, Turnipseed SB, Thompson JA. Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chem Biol Interact*. 1997; 107(3):185-200. doi: 10.1016/s0009-2797(97)00079-3.
57. Da Silva-Martinez CM. Study of the natural alkenylbenzenes compounds: mechanisms of ADN lesions and implications for human health [Tesis de Doctorado]. Lisboa: Universidad Nueva de Lisboa; 2016.
58. Medeleanu M, Ciubotariu D, Ciubotariu C. New Shape Descriptors for Quantitative Treatment of Steric Effects. III. A New Globularity Measure for QSPR/QSAR Studies. *Buletinul Științific al Universității "Politehnica" din Timisoara*. 2006; 51(65): 9-12.
59. Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, et al. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *J Med Chem*. 2014;57(12):4977–5010. doi: 10.1021/jm4004285.
60. Malta de Sa M, Mesquita-Pasqualoto KF, Rangel-Yaqui CO. A 2D-QSPR approach to predict blood-brain barrier penetration of drugs acting on the central nervous system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 46(4): 741-751.
61. Ensuncho AE, Robles JR, Figueredo SF. Modelado de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR) de los Derivados 5-(Nitroheteroaril)-1, 3,4-tiadiazol con Actividad Leishmanicida. *Información tecnológica*. 2017; 28(2): 191-202.
62. Lovering F, Bikker J, Humblet C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J Med Chem*. 2009; 52(21): 6752-6. doi: 10.1021/jm901241e.
63. Chang R. FISICOQUÍMICA para las ciencias químicas y biológicas. 3a. ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2008.
64. Gozalbes R, Doucet JP, Derouin F. Applications of topological descriptors in QSAR and drug design: history and new trends. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2002; 2(1): 93-102.
65. Harding AP, Wedge DC, Popelier PL. pK(a) prediction from "Quantum Chemical Topology" descriptors. *J Chemical Inf Model*. 2009; 49(8):1914-1924. doi: 10.1021/ci900172h.

66. Rellick LM & Becketl WJ. Comparison of van der Waals and semiempirical calculations of the molecular volumes of small molecules and proteins. *Biopolymers*. 1997; 42(2): 191-202. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(199708)42:2<191::AID-BIP8>3.0.CO;2-I.
67. Southan C, Stracz A. Extracting and connecting chemical structures from text sources using chemicalize.org. *J Cheminform*. 2013; 5(20):1-10. doi: 10.1186/1758-2946-5-20.
68. Shin J, Kim JE, Lee YW, Son H. Fungal Cytochrome P450s and the P450 Complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. *Toxins (Basel)*. 2018;10(3):112. doi: 10.3390/toxins10030112.
69. Kingsley LJ, Wilson GL, Essex EM, Markus AL. Combining Structure-and Ligand – Based Approaches to Improve Site of Metabolism Prediction in CYP2C9 Substrates. *Pharm Res*. 2015; 32(3): 986- 1001. doi: 10.1007/s11095-014-1511-3.
70. Rydberg P, Gloriam DE, Zaretski J, Breneman C, Olsen L. SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *ACS Med Chem Lett*. 2010; 1(3): 96–100. doi: 10.1021/ml100016x.
71. Sivakumar S, Anitha P, Ramesh B, Suresh G. Analysis of EAWAG-BBD pathway prediction system for the identification of malathion degrading microbes. *Bioinformation*. 2017; 13(3): 73-77. doi: 10.6026/97320630013073. eCollection 2017.
72. Smith TJ. MolView: a program for analyzing and displaying atomic structures on the Macintosh personal computer. *J Mol Graph*. 1995; 13(2): 122-125.
73. Banfi D & Patiny L. www.nmrdb.org:Resurrecting and Processing NMR Spectra Online. *Chimia*. 2008; 62(4): 280-281.
74. Castillo AM, Bernal A, Patiny L, Wist J. A new method for the comparison of ¹H NMR predictors based on tree-similarity of spectra. *J Cheminform*. 2014; 6(9): 1-6. doi: 10.1186/1758-2946-6-9.
75. Watkins AJ. A Survey of Culturable Methanogens in Contrasting Marine Sediments, their Substrates and Physiological Characteristics [Tesis de doctorado]. Cardiff: Universidad de Cardiff; 2012.
76. Fierro LN, Faúndez CA, Valderrama JO. Método de Contribución de Grupos: una Herramienta Fundamental en cursos Avanzados de Termodinámica y Física de Fluidos para la Estimación de Propiedades de Sustancias. *Formación universitaria*. 2016; 9(3): 99-108.
77. Camacho-Sandoval J. Asociación entre variables cuantitativas: análisis de correlación. *Acta Médica Costarricense*. 2008; 50(2): 94-96.
78. A. Absalan, S.A. Mesbah-Namin, T. Tiraihi, T. Taheri. The effects of cinnamaldehyde and eugenol on human adipose-derived mesenchymal stem cells viability, growth and differentiation: a cheminformatics and *in vitro* study. *Avicenna J Phytomed*. 2016; 6(6): 643-57.
79. Case DA. Chemical shifts in biomolecules. *Curr Opin Struct Biol*. 2014; 23(2): 172-176. doi: 10.1016/j.sbi.2013.01.007.